

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

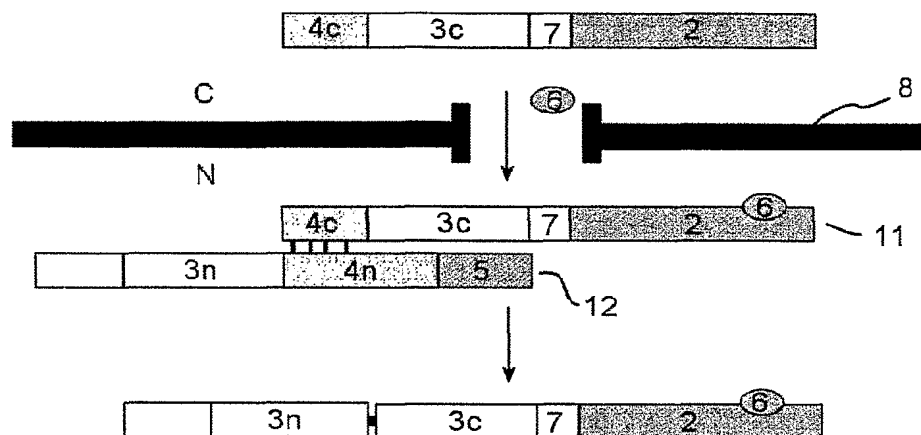
(10) 国際公開番号  
WO 2005/085439 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).  
C12Q 1/68, G01N 33/15, 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/004591 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅澤 喜夫 (UMEZAWA, Yoshio) [JP/JP]; 〒162-0063 東京都新宿区市ヶ谷薬王寺町45-1-203 Tokyo (JP). 小澤 岳昌 (OZAWA, Takeaki) [JP/JP]; 〒270-2231 千葉県松戸市椚台617-18 Chiba (JP).
- (22) 国際出願日: 2005 年 3 月 9 日 (09.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2004-66424 2004 年 3 月 9 日 (09.03.2004) JP (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: PROBES FOR DETECTING PROTEIN NUCLEAR MIGRATION AND METHOD OF DETECTING AND QUANTIFYING PROTEIN NUCLEAR MIGRATION USING THE SAME

(54) 発明の名称: 蛋白質核内移行検出用プローブとそれを用いた蛋白質核内移行の検出・定量方法



(57) Abstract: A convenient and highly accurate method for detecting protein nuclear migration due to an endogenous or foreign substance in a local area such as a vital cell or an individual organism with the use of a pair of probes for detecting protein nuclear migration, characterized in that the probes comprising a probe I having the protein, the nuclear migration of which is to be detected and quantified, connected to either the N-terminal side or the C-terminal side of a fused structure [intein-C/labeled protein-C] wherein at least a C-terminal side polypeptide obtained by halving intein is connected to a C-terminal side polypeptide obtained by halving a labeled protein in this order, and another probe II having a nuclear localization signal connected to either the N-terminal side or the C-terminal side of a fused structure [labeled protein-N/intein-N] wherein at least the remaining N-terminal side polypeptide obtained by halving intein is connected to the remaining N-terminal side polypeptide obtained by halving the labeled protein in this order.

(57) 要約: 少なくとも、inteinを2分割したうちのC-末端側のポリペプチドと、標識蛋白を2分割したうちのC-末端側のポリペプチドが順に連結された[intein-C/標識蛋白-C]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量した

[続葉有]



WO 2005/085439 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

い蛋白質が連結されてなるプローブIと、少なくとも、標識蛋白質を2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチドと、inteinを2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチドが順に連結された[標識蛋白質-N/intein-N]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブIIからなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対を用い、内在性および外来性の物質による蛋白質核内移行を、生細胞や生物個体の局所で検出するための簡便で精度高い方法とする。

## 明 細 書

### 蛋白質核内移行検出用プローブと それを用いた蛋白質核内移行の検出・定量方法

#### 技術分野

この出願の発明は、生物活性物質の作用により生じる蛋白質の核内移行を検出、定量するためのプローブ対に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、生物活性物質の作用により誘発される蛋白質の核内移行を精度高く検出、定量するためのプローブ対と、それを用いた蛋白質核内移行の検出・定量方法、並びに蛋白質の核内移行を誘発または阻害する物質をスクリーニングするための方法に関するものである。

#### 背景技術

真核細胞における複雑なシグナル伝達ネットワークは、様々な蛋白質の区画化により制御されている。また、遺伝子発現の度合いや特異性の制御には、細胞内外からの刺激に対する応答としての蛋白質の核原形質輸送が深く関わっている。そして、このような核原形質輸送は、リガンド-レセプター結合、蛋白質リン酸化、蛋白質加水分解などの蛋白質の翻訳後修飾により制御されている。

一方、腫瘍細胞内ではしばしば核蛋白質が誤った場所に局在化することが明らかになっており、蛋白質を正しい区画に再輸送させる小分子が盛んに検討されている。同様の誤った蛋白質局在化は、特定の外来性化学物質に曝された細胞においても見られることから、これらの物質が生物に与える影響が懸念される。

そこで、核原形質輸送を高速で検出できるスクリーニング方法が確立されれば、抗腫瘍活性を有する物質の発見や、物質毒性試験方法の実現

につながり、さらに、核原形質輸送のメカニズムに関する新たな知見が得られると期待される（非特許文献1～4）。

単一生細胞内において蛋白質の動態をモニタリングする技術としては、一般に、イムノアッセイによる方法や、遺伝子的に標識された緑色蛍光蛋白質（GFP）を使用する方法が知られている（非特許文献5）。これらの方法は、単一細胞内における対象蛋白質の動態を、空間的および時間的に画像化する上では効果的である。しかし、顕微鏡下で細胞内局在を確認し、定量するためには長時間を要し、さらに、生物内での動態を画像化するためには、オルガネラの抽出や切片化等の煩雑なアッセイ手順を要するという問題があった。

非特許文献1 : Kau, T. R. & Silver, P. A. Drug Discov. Today  
8, 78-85 (2003).

非特許文献2 : Kau, T. R. et al. Nat. Rev. Cancer 4, 1-12  
(2004).

非特許文献3 : Rudin, M. & Weissleder, R. Nat. Rev. Drug Discov.  
2, 123-131 (2003).

非特許文献4 : Gray, L. E., Jr. et al. Toxicology 181-  
182, 371-382 (2002).

非特許文献5 : Elion, E. A. Methods Enzymol. 351, 607-  
622 (2002).

非特許文献6 : Singh, S. M. et al. Curr. Med. Chem. 7, 211-247  
(2000).

非特許文献7 : Lorenz, W. W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
88, 4438-4442 (1991).

非特許文献8 : Mathews, J. C. et al. Biochemistry 16, 85-91  
(1977).

非特許文献9 : Paulmurugan, R. & Gambhir, S. S. Anal. Chem. 75,  
1584-1589 (2003).

- 非特許文献 10 : Kaihara, A. et al. Anal. Chem. 75, 4176-4181 (2003)
- 非特許文献 11 : Bhaumik, S. & Gambhir, S. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 377-382 (2002).
- 非特許文献 12 : Sun, L. et al. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1025-1029 (2001).
- 非特許文献 13 : Wu, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 9226-9231 (1998).
- 非特許文献 14 : Yang, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 3513-3518 (2003).
- 非特許文献 15 : Giriat, I. & Muir, T. W. J. Am. Chem. Soc. 125, 7180-7181 (2003).
- 非特許文献 16 : Chin, H. G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4510-4515 (2003).
- 非特許文献 17 : Ozawa, T. et al. Anal. Chem. 73, 5866-5874 (2001).
- 非特許文献 18 : Ozawa, T. et al. Anal. Chem. 73, 2516-2521 (2001).
- 非特許文献 19 : Ozawa, T. et al. Nat. Biotechnol. 21, 287-293 (2003).
- 非特許文献 20 : Paulmurugan, R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 15608-15613 (2002).
- 非特許文献 21 : Massoud, T. F. & Gambhir, S. S. Genes Dev. 17, 545-580. (2003).
- 非特許文献 22 : Greer, L. F., 3rd & Szalay, A. A. Luminescence 17, 43-74 (2002).
- 非特許文献 23 : Weissleder, R. & Ntziachristos, V. Nat. Med. 9, 123-128 (2003).

## 発明の開示

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、内在性および外来性の物質による蛋白質核内移行を、生細胞や生物個体の局所で検出するための簡便で精度高い方法を提供することを課題としている。

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、少なくとも、inteinを2分割したうちのC-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を2分割したうちのC-末端側のポリペプチドが順に連結された[intein-C／標識蛋白質-C]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブIと、少なくとも、標識蛋白質を2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチドと、inteinを2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチドが順に連結された[標識蛋白質-N／intein-N]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブIIからなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対を提供する。また、この出願の発明は、第2には、少なくとも、標識蛋白質を2分割したうちのN-末端側のポリペプチドと、inteinを2分割したうちのN-末端側のポリペプチドが順に連結された[標識蛋白質-N／intein-N]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブIと、少なくとも、inteinを2分割したうちの残りのC-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を2分割したうちの残りのC-末端側のポリペプチドが順に連結された[intein-C／標識蛋白質-C]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブIIからなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対を提供する。

この出願の発明は、第3には、inteinが藍藻由来のDnaEである蛋白質核内移行検出用プローブ対を、また、第4には、標識蛋白質がルシフェラーゼである蛋白質核内移行検出用プローブ対を提供する。

さらに、この出願の発明は、第5には、生物活性物質の作用によって誘発される蛋白質の核内移行を検出、定量するための方法であって、前記いずれかのプローブ対におけるプローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させ、核内における標識蛋白質のシグナルを測定することを特徴とする蛋白質核内移行検出・定量方法を提供する。

この出願の発明は、第6には、前記いずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させる蛋白質核内移行検出・定量方法を、第7には、前記いずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させる蛋白質核内移行検出・定量方法を提供する。

さらに、この出願の発明は、第8には、蛋白質の核内移行を誘発する物質をスクリーニングするための方法であって、前記いずれかのプローブ対におけるプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させ、核内移行誘発候補物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白質のシグナルを測定することを特徴とする蛋白質核内移行誘発物質のスクリーニング方法を提供する。

この出願の発明は、また、第9には、蛋白質の核内移行を阻害する物質をスクリーニングするための方法であって、前記いずれかのプローブ対におけるプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させ、核内移行阻害候補物質を細胞質に導入した後、さらに蛋白質核内移行誘発物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白質のシグナルを測定し、蛋白質核内移行誘発物質のみを細胞質に導入した場合の標識蛋白質のシグナルと比較することを特徴とする蛋白質核内移行阻害物質のスクリーニング方法を提供する。

この出願の発明は、第 10 には、前記いずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させる前記のスクリーニング方法を、そして、第 11 には、前記いずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させる前記のスクリーニング方法をも提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対の構成および作用を例示した概略模式図である。

図 2 は、COS-7 細胞に pcDRc-AR 発現ベクターを過渡的に形質移入した際の細胞の蛍光顕微鏡像および透過顕微鏡像を示す図である。(a : 抗 AR 抗体 ; b : 抗 Flag 抗体 ; 1 : DHT 未添加 ; 2 : DHT 添加)

図 3 は、この出願の発明の実施例において得られたウェスタンブロットを示した図である。(a : COS-7 細胞の蛋白質抽出物 ; b : プローブ I および II を同時発現させた細胞 (DHT 添加) ; c : プローブ I および II を同時発現させた細胞 (DHT 未添加))

図 4 は、細胞内に添加された DHT 濃度と再構築された RLuc による蛍光強度の関係を示した図である。

図 5 は、各種の内在性ホルモンおよび合成化学物質の濃度と再構築された RLuc による蛍光強度の関係を示した図である。(a : 内在性ホルモン ; b : 合成化学物質 ; c : 蛋白質核内移行阻害剤)

図 6 は、過渡的に形質移入された COS-7 細胞を移植されたマウス体内における蛋白質核内移行を示す CCD 画像である。(1 : プローブなし ; 2 : プローブ II のみ発現 ; 3 : プローブ I のみ発現 ; 4 : プローブ I および II を発現)



図 7 は、過渡的に形質移入された COS-7 細胞を移植されたマウス体内におけるフォトン値の平均を示した図である。(1 : プローブなし ; 2 : プローブ II のみ発現 ; 3 : プローブ I のみ発現 ; 4 : プローブ I および II を発現)

図 8 は、過渡的に形質移入された COS-7 細胞を移植されたマウスにセレンテラジンを i. p. 注射した後の発光動態の経時変化 (1 : プローブなし ; 2 : プローブ II のみ発現 ; 3 : プローブ I のみ発現 ; 4 : プローブ I および II を発現)

図 9 は、プローブ I および II を同時形質移入された COS-7 細胞を移植されたマウスの DHT 未注射および DHT 注射後の CCD 画像を示した図である。

図 10 は、プローブ I および II を同時形質移入された COS-7 細胞を移植されたマウスの DHT 未注射および DHT 注射後のフォトン値を示した図である。(4 匹の平均値)

図 11 は、プローブ I および II を同時形質移入された COS-7 細胞を移植されたマウスにおけるプロシミドンおよび PCB による蛋白質核内移行阻害を表す CCD 画像である。(a : 対照 (DMSO 刺激) ; b : DHT ; c : DHT + プロシミドン ; d : DHT + PCB)

図 12 は、プローブ I および II を同時形質移入された COS-7 細胞を移植されたマウスにおけるプロシミドンおよび PCB による蛋白質核内移行阻害を表すグラフである。(a : 対照 (DMSO 刺激) ; b : DHT ; c : DHT + プロシミドン ; d : DHT + PCB)

図 13 は、この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対 (蛋白質として、Glucocorticoid receptor) の構成および作用を例示した概略模式図である。

図 14 は、NIH3T3 細胞に pcDRc-GR 発現ベクターを過渡的に形質移入した際の細胞の蛍光顕微鏡像および透過顕微鏡像を示す図である。

(a : 抗 GR 抗体 ; b : 抗 Flag 抗体 ; Corti- : corticosterone 未添加 ;

Corti+ : corticosterone 添加)

図 1 5 は、細胞内に添加された Corticosterone、Dexamethasone、Cortisol、Progesterone、Testosterone、2DG、DHT、Mf (RU486)、E2 および C-terminal only (corti) それぞれの濃度と、再構築された RLuc による蛍光強度の関係を示した図である。

図 1 6 は、過渡的に形質移入された NIH3T3 細胞を移植されたマウス体内における蛋白質核内移行を示す CCD 画像である。(1 : プローブなし ; 2 : プローブ II のみ発現 ; 3 : プローブ I のみ発現 ; 4 : プローブ I および II を発現)

図 1 7 は、この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対 (蛋白質として、Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2) の構成および作用を例示した概略模式図である。

図 1 8 は、細胞に pcDRc-SREBP 発現ベクターを過渡的に形質移入した際の細胞の蛍光顕微鏡像および透過顕微鏡像を示す図である。(a : N-terminal protein の検出 ; b : SREBP-2 の検出 ; 矢印 1 : 核移行前 (局在) の状態 ; 矢印 2 から 4 : 核移行後の状態 ; +chol : コレステロール存在下 ; -chol : コレステロール非存在下)

図 1 9 は、細胞内に添加されたコレステロール濃度 (chol) と、再構築された RLuc による蛍光強度の関係を示した図である。

図 2 0 は、この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対 (蛋白質として、Signal Transducer and Activator of Transcription 3) の構成および作用を例示した概略模式図である。

図 2 1 は、HEK293 細胞に pcDRc-STAT-3 発現ベクターを過渡的に形質移入した際の細胞の蛍光顕微鏡像および透過顕微鏡像を示す図である。

(a : 抗 Flag 抗体 ; b : 抗 STAT 抗体 ; OSM- : OSM 未添加 ; OSM+ : OSM 添加)

図 2 2 は、細胞内に添加された OSM 濃度と、再構築された RLuc による蛍光強度の関係を示した図である。

なお、図中の符号は次のものを示す。

- 1 蛋白質核内移行検出用プローブ対
  - 11 プローブ I
  - 12 プローブ II
- 2 蛋白質
- 3 標識蛋白
  - 3c 標識蛋白のC-末端側のポリペプチド
  - 3n 標識蛋白のN-末端側のポリペプチド
- 4 intein
  - 4c inteinのC-末端側のポリペプチド
  - 4n inteinのN-末端側のポリペプチド
- 5 核局在化シグナル
- 6 生物活性物質、蛋白質核内移行誘発物質
  - 6' 核内移行誘発候補物質
  - 6'' 核内移行阻害候補物質
- 7 リンカー
- 8 核膜

#### 発明を実施するための最良の形態

図1にこの出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対の原理を表す概略模式図を示した。すなわち、この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対(1)は、少なくとも、intein(4)を2分割したうちのC-末端側のポリペプチド(4c)と、標識蛋白(3)を2分割したうちのC-末端側のポリペプチド(3c)が順に連結された[intein-C/標識蛋白-C]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質(2)が連結されてなるプローブI(11)と、少なくとも、標識蛋白(3)を2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチド(3n)と、intein(4)を2分割したうちの残りのN-末端側

のポリペプチド (4n) が順に連結された [標識蛋白-N/intein-N] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナル (5) が連結されてなるプローブ II (12) からなるもの、もしくは、少なくとも、標識蛋白 (3) を2分割したうちのN-末端側のポリペプチド (3n) と、intein (4) を2分割したうちのN-末端側のポリペプチド (4n) が順に連結された [標識蛋白-N/intein-N] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質 (2) が連結されてなるプローブ I (11) と、少なくとも、intein (4) を2分割したうちの残りのC-末端側のポリペプチド (4c) と、標識蛋白 (3) を2分割したうちの残りのC-末端側のポリペプチド (3c) が順に連結された [intein-C/標識蛋白-C] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナル (5) が連結されてなるプローブ II (12) からなるものである。

これらのプローブ対は、細胞内に導入されて使用されるが、そのときプローブ I (11) は細胞質に、プローブ II (12) は核内に局在化される。プローブ I (11) における蛋白質 (2) が核内移行誘発物質 (6) と結合した場合、プローブ I (11) は、細胞質 (C) 側から核内 (N) へ移行し、プローブ II (12) と近接する。すると2分割された intein (4) の二つの部位 (4c、4n) が接近して正しく折りたたまれ、これにより、スプライシングが起こり、プローブ I (11) およびプローブ II (12) から intein (4) が切り出され、2分割された標識蛋白 (3) の二つの部位 (3c、3n) がペプチド結合により連結され、標識蛋白 (3) が再構築される。

一方、プローブ I (11) における蛋白質 (2) が核内移行誘発物質 (6) と結合しない場合には、intein (4) のスプライシングが起こらないため、標識蛋白 (3) は再構築されない。

したがって、この標識蛋白 (3) のシグナルを測定することにより、蛋白質 (2) の核内移行を検出することができる。

以上のとおりの蛋白質核内移行検出用プローブ対において、プローブ

I (11) は、[蛋白質 (2) /intein-C (4c) /標識蛋白-C (3c)] の構成を有する直列融合蛋白質、[intein-C (4c) /標識蛋白-C (3c) /蛋白質 (2)] の構成を有する直列融合蛋白質、[蛋白質 (2) /標識蛋白-N (3n) /intein-N (4n)] の構成を有する直列融合蛋白質、または [標識蛋白-N (3n) /intein-N (4n) /蛋白質 (2)] の構成を有する直列融合蛋白質のいずれかであるが、このようなプローブ I には、これらの部位以外にも、各部位の間等にリンカー配列 (7) としてポリペプチド等が含まれていてもよい。

同様に、プローブ II (12) は、[標識蛋白-N (3n) /intein-N (4n) /核局在化シグナル (5)] の構成を有する直列融合蛋白質、[核局在化シグナル (5) /標識蛋白-N (3n) /intein-N (4n)] の構成を有する直列融合蛋白質、[intein-C (4c) /標識蛋白-C (3c) /核局在化シグナル (5)] の構成を有する直列融合蛋白質、または、[核局在化シグナル (5) /intein-C (4c) /標識蛋白-C (3c)] の構成を有する直列融合蛋白質のいずれかであるが、これらの部位以外にも、各部位の間等に、リンカー配列 (7) としてポリペプチド等を含んでいてもよい。

この出願の発明の核内移行検出用プローブ対 (1) において、プローブ I (11) に含まれる蛋白質 (2) は、核内移行を検出・定量したいものであるとよく、とくに限定されない。例えば、よく知られた核ホルモン受容体であるアンドロゲンレセプター (AR) が例示される。AR は  $5\alpha$ -ジヒドロテストステロン (DHT) に結合することにより細胞質から核内へ移行することが知られている (非特許文献 6)。また、ダイオキシンにより核内移行することが知られるアリル炭化水素受容体 (AhR)、甲状腺ホルモンにより核内移行することが知られる甲状腺ホルモン受容体 (ThR)、コレステロールセンサーとして知られる sterol responsive element binding protein (SREBP)、細胞増殖シグナルに関与する mitogen-activated protein kinase (MAPK)、アポトーシスを誘導する nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) 等も例示される。

一方、この出願の発明の核内移行検出用プローブ対 (1) において、プローブ II (12) に含まれる核局在化シグナル (5) は、プローブ II (12) が細胞内に導入された際に、プローブ II (12) が核内 (N) に局在化されるようにするためのものであり、その構造や配列はとくに限定されない。具体的には、配列番号 1 のものが例示される。もちろん、これ以外にも、Nucleoplasmin 由来のもの (配列番号 2)、HIV-1 Rev 由来のもの (配列番号 3) 等の公知の核局在化配列 (NLS) が適用できる。

この出願の発明の核内移行検出用プローブ対 (1) において 2 分割されて各々 C-末端側のポリペプチド (3c)、N-末端側のポリペプチド (3n) としてプローブ I (11) およびプローブ II (12) で使用される標識蛋白 (3) は、intein (4) のスプライシングにより直接ペプチド結合し、再構築されて解析可能となるものであれば、どのようなものであってもよい。例えば、蛍光蛋白や発光触媒酵素が好ましく適用される。緑色蛍光蛋白 (GFP) などの蛍光蛋白は、連結されたとき発光し、可視的に解析でき、好ましい。また、ルシフェラーゼ等の発光触媒酵素も連結されて活性中心を形成し、ルミノメーターで容易に検出可能な光を発するため好ましい。とくに、レニラルシフェラーゼ (RLuc) は、分子量が 36-kDa と小さく、活性化に ATP や翻訳後修飾が不要であることから、好ましい (非特許文献 7、8)。分割された RLuc の N-および C-末端が、夫々個々では蛍光を示さず、結合して再び活性を取り戻すようにするためには、活性中心を 2 つに分割するような分け方をするとよい。具体的には、G229 と K230 の間で切断することが好ましいことが報告されている (非特許文献 9、10)。また RLuc の基質である腔腸ルシフェリン (セレンテラジン) が細胞膜を透過し、in vivo での可視化に十分な強度の蛍光を生じることからも、RLuc が好ましいといえる (非特許文献 11)。

さらに、この出願の発明の核内移行検出用プローブ対 (1) において、2 分割されて各々 C-末端側のポリペプチド (4c)、N-末端側のポリペプチド (4n) としてプローブ I (11) およびプローブ II (12) で使用

される intein (4) としては、種々の生物由来の公知のものが適用できる。プローブ I (11) における蛋白質 (2) と核内移行誘発物質 (6) が相互作用し、プローブ I (11) が核内 (E) に移行してプローブ II (12) と近接することにより intein (4) が自動的に切り出されるためには、intein (4) は、部位特異的エンドヌクレアーゼであることが好ましい。具体的には、酵母 VMA 由来の intein や藍藻由来の DnaE intein が好ましく例示される。中でも藍藻由来の DnaE は、strain PCC6803 の DNA 配列が明らかになっている上、天然の分割 intein であるため、扱い易い。  
(非特許文献 12 ~ 20)

さらに、この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対 (1) において、intein (4) のスプライシングが有効に起こるためには、プローブ I (11) とプローブ II (12) が核内で近接した際に、プロテインスプライシングに関与する二つの部位が正しく折り畳まれ、かつ、正確に並べられなければならない。したがって、intein としては、生物由来のものをそのまま用いてもよいが、一部のアミノ酸残基を変換したり、削除したり、適当なリンカー配列を導入したりして、スプライシングが起こりやすいように設計されたものを使用してもよい。

この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対 (1) では、例えば、2 分割された intein (4) の一方のポリペプチド (例えば、C-末端側: 4c) が、2 分割された標識蛋白 (3) の一方のポリペプチド (この場合、3c) に連結された [intein-C (4c) / 標識蛋白-C (3c)] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質 (2) が連結されてプローブ I (11) を構成する。

また、プローブ I で使用されなかった標識蛋白 (3) のもう一方のポリペプチド (前記の例では、3n) が、プローブ I で使用されなかった intein (4) のもう一方のポリペプチド (この場合、N-末端側: 4n) に順に連結された [標識蛋白-N (3n) / intein-N (4n)] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナル (5) が連結されてプ

ローブ II (12) を構成する。

このような蛋白質核内移行検出用プローブ対 (1) において、intein-C (4c) と標識蛋白-C (3c) や [intein-C (4c) / 標識蛋白-C (3c)] 融合構造と蛋白質、標識蛋白-N (3n) と intein-N (4n) や [標識蛋白-N (3n) / intein-N (4n)] 融合構造と核局在化シグナル (5) は、蛋白質 (2)、核局在化シグナル (5)、各プローブ (11、12) 等の作用に影響を及ぼさなければ、どのような方法で連結されたものであってもよい。例えば、通常用いられる化学的、生物化学的、あるいは、遺伝子工学的手法が適用できる。

この出願の発明では、以上のとおりの蛋白質核内移行検出用プローブ対 (1) を用いて蛋白質 (2) の核内移行を検出・定量する方法が提供される。具体的には、前記のプローブ対 (1) におけるプローブ I (11) を細胞質中 (C) で生物活性物質 (6) と共存させ、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させ、核内 (N) における標識蛋白 (3) のシグナルを測定する。

このような蛋白質核内移行の検出・定量方法では、プローブ I (11) は細胞質 (C) に留まり、プローブ II (12) は核局在化シグナル (5) の存在により核内 (N) に局在化するが、蛋白質 (2) が生物活性物質 (6) を認識、結合することによりプローブ I (11) が細胞質 (C) から核内 (N) へ移行する。すると、プローブ I (11) とプローブ II (12) が近接し、これらにおける 2 分割された intein (4) がスプライシングにより切り出されて標識蛋白 (3) が再構築される。したがって、標識蛋白 (3) のシグナルを測定すれば、生物活性物質 (6) による蛋白質 (2) の核内移行を精度高く検出することが可能となる。また、予め標識蛋白 (3) の濃度と標識蛋白 (3) のシグナル強度の関係から検量線を求めれば、蛋白質 (2) の核内移行量を定量することも可能となる。

この出願の発明の蛋白質核内移行の検出・定量方法において、プローブ I (11) と生物活性物質 (6) を細胞質 (C) 中で共存させ、プローブ



II (12) を核内 (N) に局在化させるためには、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することができる。あるいは、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I (11) と生物活性物質 (6) を細胞質中で共存させ、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させることもできる。

この出願の発明では、さらに、蛋白質 (2) の核内移行を誘発する物質をスクリーニングするための方法も提供される。すなわち、前記いずれかのプローブ対 (1) におけるプローブ I (11) を細胞質 (C) に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させ、核内移行誘発候補物質 (6') を細胞質 (C) に共存させ、その後、核内 (N) における標識蛋白質のシグナルを測定することにより核内移行誘発物質をスクリーニングできる。

核内移行誘発候補物質 (6') がプローブ I (11) における蛋白質 (2) と相互作用し、この蛋白質 (2) の核内移行が誘発されるとき、プローブ I (11) が細胞質 (C) から核内 (N) へ移行し、核内 (N) に局在化されたプローブ II (12) と近接する。これにより 2 分割された intein の一方のポリペプチド (例えば、C-末端側: 4c) ともう一方のポリペプチド (4n) が近接し、スプライシングが起こり、次いで 2 分割された標識蛋白 (3c および 3n) がペプチド結合して標識蛋白 (3) が再構築される。したがって、この標識蛋白 (3) のシグナルを測定すれば、核内移行が起こったか否かを確認でき、核内移行を起こした物質を核内移行誘発物質として判定することが可能となる。

この出願の発明の核内移行誘発物質のスクリーニング方法において、プローブ I (11) を細胞質 (C) に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させるためには、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入する方法が適用される。あるいは、プローブ対 (1)

を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生すれば、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I (11) を細胞質に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させることができる。

さらに、この出願の発明では、蛋白質核内移行阻害物質をスクリーニングする方法が提供される。すなわち、前記いずれかのプローブ対 (1) におけるプローブ I (11) を細胞質 (C) に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させ、まず、核内移行阻害候補物質 (6'') を細胞質 (C) に導入する。その後、蛋白質核内移行誘発物質 (6) を細胞質に導入して核内 (N) における標識蛋白のシグナルを測定し、その結果を、蛋白質核内移行誘発物質 (6) のみを細胞質 (C) に導入した場合の標識蛋白のシグナルと比較することにより核内移行阻害物質をスクリーニングできる。

核内移行阻害候補物質 (6'') がプローブ I (11) における蛋白質 (2) と蛋白質核内移行誘発物質 (6) の結合を阻害する場合、標識蛋白 (3) のシグナル強度は、核内移行阻害候補物質 (6'') 存在下で、核内移行阻害候補物質 (6'') 非存在下（すなわち核内移行誘発物質 (6) のみ存在時）に比べて減少する。したがって、このように、標識蛋白 (3) のシグナルを減少させる物質を核内移行阻害物質として判定することができる。

このような核内移行阻害物質のスクリーニング方法においても、プローブ I (11) を細胞質 (C) に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させるためには、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入する方法が適用される。あるいは、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生すれば、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I (11) を細胞質に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させることができる。

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

## 実施例

### 〔手順〕

#### (1) プラスミドの構築

PCR により、RLuc の N-末端側ドメインをエンコードする cDNA (RLuc-N ; 1~229 AA) の C-末端に配列番号 4 のペプチド (KFAEYC) を、また N-末端に配列番号 5 に示される FLAG エピトープ (DYKDDDDK) を導入した。さらに、修飾 RLuc-N をエンコードする cDNA を、未変性の HindIII サイトにより、DnaE の N-末端側ドメインをエンコードする cDNA (DnaE-N ; 1~123 AA) に融合した。そして、DnaE-N の C-末端側ドメインをエンコードする cDNA を、NcoI サイトにより、核局在シグナル (配列番号 1 : NLS ; (DPKKKRKV) 3) の cDNA に融合した。

PCR により、RLuc の C-末端側ドメインをエンコードする cDNA (RLuc-C ; 230~311 AA) の N-末端に配列番号 6 のペプチド (FNLSH) とユニークな酵素部位 MunI を、また C-末端に配列番号 7 のリンカー (GGGGSG) とユニークな酵素部位 NotI を導入した。

さらに、PCR により、AR をエンコードする cDNA (1~918 AA) の N-末端にユニークな酵素部位である NotI を、C-末端に XhoI を導入した。この修飾 RLuc-C をエンコードする cDNA は、MunI 部位により DnaE の C-末端側断片をエンコードする cDNA (DnaE-C ; 1~36 AA) に融合し、NotI 部位により全長 AR をエンコードする cDNA に融合した。

これらは、発現ベクター pcDNA 3.1(+) (Invitrogen) の酵素部位 BamHI および XhoI 部位にサブクローニングされた。

なお、PCR 生成物の忠実度は、BigDye Terminator Cycle Sequencing

kit ならびに遺伝子分析機 ABI Prism310 (PE Biosystems) を用いたシーケンス解析により確認した。

## (2) 細胞培養と形質移入

COS-7 細胞の培養は、10 %ステロイド除去ウシ胎児血清(木炭抽出 FBS)と 1 %ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した DMEM 中、5 % CO<sub>2</sub>、37 °C の条件下で行った。

細胞を 12 ウェルの培養プレート上に播種した後、lipofectAMINE2000 (Invitrogen)を用いて、前記のプラスミド 2 µg の形質移入を行った。

## (3) ウエスタンブロット分析

pcRDn-NLS または pcDRc-AR を COS-7 細胞に形質移入し、24 時間インキュベートした。細胞を PBS 中で 1 回洗浄し、200 µl の溶解緩衝液(1 %ドデシル硫酸ナトリウム、10 %グリセリン、10 % 2-メルカプトエタノール、0.001 %ブロモフェノールブルー、50 mM Tris-HCl、pH 6.8) 中で可溶化した。等量の試料を 6 %アクリルアミドゲル中で電気泳動し、ニトロセルロース膜上に転写した後、マウス抗 AR 抗体 (Santa Cruz) でブロット処理した。ブロットはアルカリホスファターゼ結合二次抗体存在下でインキュベートし、ケミルミネッセンス (New England Biolabs) により可視化した。

## (4) 免疫細胞化学手法

COS-7 細胞の培養は、顕微鏡ガラススライド上で直接行い (2×10<sup>5</sup> 細胞/スライド)、構築されたプラスミドにより形質移入を行った。形質移入された細胞は、3 %パラホルムアルデヒド溶液で固定した。細胞を 0.2%魚皮ゼラチンでブロッキングした後、マウス抗 AR 抗体 (Santa Cruz) またはマウス抗 FLAG 抗体 (Sigma) 存在下でインキュベートした。さらに、細胞を Cy-5-複合化二次抗体によりインキュベートし、647 nm カットオフフィルタと 665 nm I.P. フィルタを装着した共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss) を用いて記録した。

## (5) in vitro アッセイ (細胞)

プラスミドを用いて COS-7 細胞に形質移入し、12 時間インキュベートした。培養液を 10 %FBS 添加 DMEM に置換し、その 24 時間後に各ウェルにステロイドホルモンまたは合成化学物質を添加した。

さらに、COS-7 細胞を 2 時間インキュベートし、細胞を収集して、ルシフェラーゼ活性を、Renilla luciferase assay kit (Promega) により、ルミノメータ (Minilumat LB9506 ; Berthold GmbH) (積分時間 20 秒) を用いて評価した。

#### (6) in vivo イメージング (マウス)

前記(1)で構築したプラスミド pcRDn-NLS および pcDRc-AR を、COS-7 細胞に個別に形質移入、または同時形質移入した。形質移入後、10% FBS 添加 DMEM 中で 12 時間にわたりインキュベートし、細胞を収集した。この細胞を PBS 中に懸濁し、 $1 \times 10^6$  個細胞を含む分割量を、麻酔した BALB/c ヌードマウス (メス、5 週齢、体重約 17 g) の背中の異なる 4 カ所に移植した。

移植 12 時間後、100  $\mu$ l の DHT (100  $\mu$ g/kg 体重) または 1.0% (vol/vol) DMSO (溶媒) を腹腔内 (i. p.) 注射した。注射の 2 時間後、100  $\mu$ l のセレンテラジン (2.8 mg/kg 体重) を i. p. 注射し、2 分間隔でマウスのイメージングを行った。

RLuc 活性に対する DHT の影響を調べるため、2 群のヌードマウスの背中に、COS-7 細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞) を直接注入した。2 群のうち最初のマウス群には、100  $\mu$ l の 1.0 % (vol/vol) DMSO (溶媒) を i. p. 注射した。第 2 群には 100  $\mu$ l の DHT (100  $\mu$ g/kg 体重) を注射した。3 時間後に 100  $\mu$ l のセレンテラジン (1.4 mg/kg 体重) を i. p. 注射し、10 分後にマウスのイメージングを行った (n=4)。

脳実験のために、前記のプラスミド pcRDn-NLS および pcDRc-AR の両方を形質移入した COS-7 細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞) を、1 mm の穿刺孔から 3 mm の深さでヌードマウスの前脳に移植した。移植直後、4 群のうち第 1 および第 2 マウス群には、100  $\mu$ l の 1.0 % DMSO を i. p. 注射した。第 3 お

よび第 4 マウス群には 1.0 % DMSO に溶解した 100  $\mu$ l のプロシミドンと PCB (10 mg/kg 体重) をそれぞれ i. p. 注射した。

注射 1 時間後に、第 2 および第 3 マウス群に 1.0% DMSO に溶解した 100  $\mu$ l の DHT (10  $\mu$ g/kg 体重) を i. p. 注射した。このホルモン刺激の 2 時間後、10  $\mu$ l のセレンテラジン (1.4 mg/kg 体重) を側脳室内 (i. c.) 注射し、各マウス群の代表 (n=3) を取り、2 分間隔で同時にイメージングを行った。

なお、全てのマウスイメージングは冷却 CCD カメラ (IVIS100 system、Xenogen) を用いて行った。マウス内への注入細胞より放出されたフォトンを集集し、1 分間隔で積算した。画像処理は LIVING IMAGE software (Xenogen) を用いて行った。測定光を定量するため、細胞注入領域上に解析対象領域 (ROI) を描き、平均発光強度 (フォトン/秒/cm<sup>2</sup>) を計算した。

#### <実施例 1>

RLuc と DnaE の C 末端ドメインに連結された AR (すなわち、プローブ I) が、哺乳動物細胞内の細胞下区画に正しく局在化されることを確認するために、COS-7 細胞に pcDRc-AR 発現ベクターを過渡的に形質移入した。

DHT の非存在下では、プローブ I は主として細胞質中に存在していた (図 2 a-1) が、DHT を添加したところ、プローブ I が核へ移行した (図 2 a-2)。一方、核局在化シグナル (NLS) を有する RLuc ドメインと DnaE の N 末端ドメイン (すなわち、プローブ II) は、DHT の存在・非存在に関わらず、核内に局在化していた (図 2 b)。

この結果は、ウエスタンブロット分析の結果とも一致した (図 3)。DHT 非存在下では、AR 抗体は、プローブ I プラスミドとプローブ II プラスミドを含む細胞粗抽出液において、スプライシングされていない前駆体、すなわち RLuc-C と DnaE-C に連結された 115 kDa の AR という特定成分だけを認識した。

一方、DHT 存在下では、AR 抗体は、スプライシングされていない前駆体とともに、135kDa と 160kDa のポリペプチド物質を認識した。なお、これらの物質の電気泳動移動度は、スプライシング後の生成物とスプライシング中間体の予想分子量にそれぞれ合致していた。

以上の結果から、DHT が AR に結合することにより核内移行が起こり、プローブ対におけるスプライシングが起こることが確認された。

### <実施例 2>

次にこの出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対を用いて AR の核内移行を定量できることを確認するために、*in vitro* 細胞アッセイを用いて、DHT が誘発するプローブ I の核内移行を測定した。

COS-7 細胞に pcRDn-NLS と pcDRc-AR の両方または pcRDn-NLS 単独を形質移入し、それぞれのウェルに各種濃度の DHT を添加した。細胞を収集し、その溶解物にセレンテラジン溶液を混合した。

蛍光測定を行ったところ、DHT 濃度の増加に伴い蛍光強度が増大することが確認された。また、その蛍光強度は、バックグラウンドの蛍光と十分区別できるレベルであった（図 4）。

以上の結果より、この出願の発明のプローブ対を用いて AR の核内移行を定量できることが示された。

### <実施例 3>

この出願の発明のプローブ対を用いて、各種の内在性ホルモンや合成化学物質による AR の核内移行を確認した。

図 5 より、テストステロンや 19-ノルテストステロンなどの内在性アンドロゲンは、 $10^{-8}$  M から  $10^{-5}$  M の濃度範囲で大きな蛍光強度を示すことが明らかになった。テストステロンと 19-ノルテストステロンの  $10^{-6}$  M 濃度における相対強度は、それぞれ同濃度の DHT に対する強度の 72% と 64% であった（図 5 a）。また、内在性ステロイドホルモンの  $17\beta$ -エストラジオールとプロゲステロン、合成ステロイドホルモンの酢酸シプロテロン（CPA）、抗アンドロゲン合成化学物質のピンクロゾリンとフルタ

ミドは、同様に蛍光強度を僅かに増加させた（図 5 b）。逆にプロシミドンは試験対象の濃度範囲では、蛍光強度の特異的増加を全く誘発しなかった。

反対に、プロシミドンは DHT に誘発される強い蛍光を阻害することが明らかになった（図 5 c）ことから、AR がプロシミドンに結合しても、AR の核内移行が誘発されないことが示された。

他の試験物質では o, p'-DDT が少量の AR を核内移行させることが明らかになったが、PCB 同属種である Aroclor 1254 は、DHT が誘発する AR の核内移行を阻害することが確認された。

#### <実施例 4>

次に、この出願の発明のプロープ対を用いて、化合物の動物細胞小器官における分布を観察できることを確認した。

冷却 CCD カメラを用いた工学的な生物発光イメージング技術は、操作の容易性、習得時間の短さ、複数マウスを一度に同時測定できる等の利点を有し、高速イメージングを可能とする（非特許文献 3、21～23）。

生きたマウス内で再構築された RLuc の発する蛍光強度が CCD カメラによる検出に足りる十分な強度を有することを確認するため、100 万個の非形質移入 COS-7 細胞（参考例）、pcRDn-NLS または pcDRc-AR を過渡的に形質移入した細胞、もしくは pcRDn-NLS と pcDRc-AR の両者を同時形質移入した細胞を、生きたマウスの背面各箇所真皮内部に注入した。

8～35 分経過後に冷却 CCD により観察されたマウス画像には、pcRDn-NLS と pcDRc-AR の作成物を含む細胞注入部位だけに顕著な蛍光シグナルが現れた（図 6～8）。15 分経過時点で 2 つを同時に形質移入した細胞による蛍光強度は、pcRDn-NLS または pcDRc-AR のいずれかを単独で形質移入した細胞による強度の 20 倍を上回ったことから、生きたマウスの真皮層内部で、RLuc の再構築による生体蛍光が精度高く検出できることが確認された。

#### <実施例 5>



そこで、生きたマウス中での DHT 依存性の AR 核内移行を観察するために、2 グループの生きたマウスの背面に、プラスミド pcRDn-NLS と pcDRc-AR の両方を同時に過渡的形質移入した COS-7 細胞を移植し、溶媒 (DMSO) または DHT により刺激した。

一方のマウス群 4 匹には 2 時間にわたり 1.0 % DMSO (溶媒) による刺激を行い、もう一方のマウス群 4 匹には同じ時間 DHT (100  $\mu$ g/kg 体重) による刺激を行った。DHT 刺激による 蛍光強度は、溶媒刺激の場合と比べて 3.5 倍増加していた (図 9、10)。

以上の結果から生きたマウスを対象に、DHT 非存在下に対する DHT 存在下での AR の核内移行度の差を画像化し、定量評価できることが確認された。

#### <実施例 6>

さらにまた、この出願の発明のプロープ対を用いて、マウス脳内における AR の核内移行に対する阻害物質の影響を調べた。

pcRDn-NLS と pcDRc-AR を同時に形質移入した細胞をマウス脳内に 3mm の深さで注入し、1.0 % DMSO に  $10^{-7}$  M DHT 単独、またはそれ以外に各濃度のプロシミドンか PCB を加えた各種のホルモン混合液を腹腔内 (i. p.) 注入した。

脳より得られるフォトン計数値が、DMSO 処置を行った対照のフォトン計数値と比較して顕著に増加した (図 11、12) ことから、DHT により AR の核内移行が誘発されたことが示唆された。

なお、3 匹のマウスより得たデータを平均したところ、生物発光の増加量は対照の発光強度に比べて大きかった。DHT に加えてプロシミドンあるいは PCB を同時に注射すると蛍光強度が減少したことから、これらが 2 時間以内に血液脳関門を通過し、AR の核内移行を阻害できることが示唆された。

#### <実施例 7>

Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体: GR) の核内

移行検出プローブによる、核内移行の検討を行った。

プラスミドの構築は、まず、実施例 1 から 6 で用いたプラスミド pcDRc-AR を制限酵素 NotI と XhoI で切断し、AR をコードする cDNA を取り除いた。このプラスミドに、glucocorticoid receptor (GR) をコードする cDNA を NotI と XhoI サイトで連結し、プラスミドを構築した (図 1 3)。この作製したプラスミドを用いて、上記 AR の場合と同様の実験を行った。

なお、PCR により、RLuc の N-末端側ドメインをエンコードする cDNA (RLuc-N; 1~229 AA) の C-末端には、配列番号 8 のペプチド (KFAEY) を、また、RLuc の C-末端側ドメインをエンコードする cDNA (RLuc-C; 230~311 AA) の N-末端には配列番号 9 のペプチド (CFNLSH) を導入した。

#### (1) GR の局在の確認

RLuc と DnaE の C 末端ドメインに連結された GR が動物細胞内の細胞内器官に正しく局在していることを確認するために、NIH3T3 細胞に pcDRc-GR 発現ベクターを遺伝子導入した。

結果、corticosterone 非存在下では、プローブ I は主として細胞質中に存在していた (図 1 4 の上段、図中の「Corti-」)。その一方で、corticosterone を添加したところ、プローブ I が核へ移行したことを確認できた (図 1 4 の 2 段目、図中の「Corti+」)。

#### (2) GR の核内移行の定量

次に、このプローブを用いて GR の核内移行を定量できることを確認するために、in vitro 細胞アッセイを用いて、corticosterone が誘発するプローブ I の核内移行を測定した。

NIH3T3 細胞に pcRDn-NLS と pcDRc-GR の両方を遺伝子導入し、それぞれのウェルに各種濃度の corticosterone を添加した。細胞を収集し、その溶解物にセレンテラジン溶液を混合した。

発光測定を行ったところ、corticosterone 濃度の増加に伴い、発光強

度が増大することが確認された。また、その発光強度は、バックグラウンドの蛍光と充分区別可能であった。

この出願の発明のプロープ対を用いて、合成化学物質による GR の核内移行を確認した。図 1 5 に示したとおり、dexamethasone、progesterone、cortisol が GR の核内移行を誘導することがわかった。

### (3) マウス個体における GR 核内移行

次にこの出願の発明のプロープを用いて、マウス個体内における GR 核内移行を観察できることを実証した。PcRDn-NLS と pcDRc-GR を同時に遺伝子導入した NIH3T3 細胞を、生きたマウスの背面各所の真皮内部に注入した(図 1 6)。1 2 時間後、マウスを 1 0 分間水浴中で泳がせ、ストレスを与えた。1 時間後セレンテラジンを投与して、CCD カメラにより発光強度測定を行った。

その結果、図 1 6 に示したとおり、ストレスを与えたマウス(図中の「swimming(+)」)からは、ストレスを与えなかったマウス(図中の「swimming(-)」)に対し、強い発光強度を観測できた。

以上から生きたストレス刺激によるマウスの生理的 corticosterone 濃度上昇を、RLuc の再構成により精度よく検出することが確認できた。

### <実施例 8>

Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2) 核内移行検出プロープによる、核内移行検出の検討を、実施例 7 と同様の手法によって行った。

プラスミドの構築は、実施例 1 から 6 で用いたプラスミド pcDRc-AR を制限酵素 NotI と XhoI で切断し、AR をコードする cDNA を取り除いた。このプラスミドに、SREBP-2 をコードする cDNA を NotI と XhoI サイトで連結し、プラスミドを構築した(図 1 7)。このプラスミドを pcDRc-SREBP とした。

なお、PCR により、RLuc の N-末端側ドメインをエンコードする cDNA (RLuc-N; 1~229 AA) の C-末端には、配列番号 4 のペプチド (KFAEYC)

を、また、RLuc の C-末端側ドメインをエンコードする cDNA (RLuc-C ; 230~311 AA) の N-末端には配列番号 9 のペプチド (CFNLSH) を導入した。

#### (1) SERBP-2 の局在の確認

Rluc と DnaE の C 末端ドメインに連結された SERBP-2 が、動物細胞内の細胞内器官に正しく局在していることを確認するために、COS-7 細胞に pcDRc-SREBP 発現ベクターを遺伝子導入した。

結果、コレステロール存在下 (図 18 中の「+chol」) では、SREBP-2 を連結したプローブは主として細胞質中に存在していた (図 18 の (1))。一方、コレステロール非存在下 (図 18 中の「-chol」) では、プローブが核へ移行した (図 18 の (2) から (4))。

#### (2) SERBP-2 の核内移行の定量

次に、SERBP-2 の核内移行の定量を、実施例 7 と同様の手法で行った。COS-7 細胞に pcRDn-NLS と pcDRc-SREBP の両方を遺伝子導入し、それぞれのウェルに各種濃度のコレステロールを添加した。細胞を収集し、その溶解物にセレンテラジン溶液を混合した。

発光測定を行ったところ、コレステロール濃度の減少に伴い、発光強度が増大することが確認された (図 19)。また、その発光強度は、バックグラウンドの蛍光と充分区別可能であった。以上から、SREBP-2 の核内移行の程度を、発光強度を指標に検出できることが分かった。

#### <実施例 9>

Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT-3) 核内移行検出プローブによる、核内移行検出の検討を、実施例 7 および 8 と同様の手法によって行った。

プラスミドの構築は、実施例 1 から 6 で用いたプラスミド pcDRc-AR を制限酵素 NotI と XhoI で切断し、AR をコードする cDNA を取り除いた。次いで、このプラスミドに、STAT-3 をコードする cDNA を NotI と XhoI サイトで連結して、プラスミドの構築を行った (図 20)。このプラス

ミドを pcDRc-STAT3 とし、これを用いた。

#### (1) STAT-3 の局在の確認

Rluc と DnaE の C 末端ドメインに連結された STAT-3 が動物細胞内の細胞内器官に正しく局在していることを確認するために、HEK293 細胞に pcDRc-STAT3 発現ベクターを遺伝子導入した。

結果、リガンドの一つである oncostatin M (OSM) 非存在下では、STAT-3 を連結したプローブは主として細胞質中に存在していた (図 2 1 の「OSM-」)。そして、OSM を添加したところ、プローブが核へ移行することが確認された (図 2 1 の「OSM+」)。

#### (2) STAT-3 の核内移行の定量

次に、SERBP-2 の核内移行の定量を、実施例 7、8 と同様の手法で行った。

HEK293 細胞に pcRDn-NLS と pcDRc-STAT3 の両方を遺伝子導入し、それぞれのウェルに各種濃度の OSM を添加した。細胞を収集し、その溶解物にセレンテラジン溶液を混合した。

発光測定を行ったところ、OSM 濃度の増加に伴い、発光強度が増大することが確認された (図 2 2)。また、その発光強度は、バックグラウンドの蛍光と充分区別可能であった。以上から、STAT-3 核内移行の程度を、発光強度を指標に定量的に検出できることが確認できた。

#### 産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、生細胞や生物での蛋白質の核内移行を非侵襲的にイメージングできる方法が提供される。また、この発明により、蛋白質核内移行の程度を簡便に定量する方法も提供される。この出願の発明のプローブ対を用いた蛋白質核内移行の検出・定量方法は、従来の蛍光技術と異なり、生物発光法によるためバックグラウンドシグナルが無いことから、高精度・高感度での検出が可能である。したがって、治療や毒性化学物質の特定等、薬品開発や創薬の

プロセスへの応用が期待される。

上記第 1 の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対は、少なくとも、intein を 2 分割したうちの C-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を 2 分割したうちの C-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白質-C] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブ I と、少なくとも、標識蛋白質を 2 分割したうちの残りの N-末端側のポリペプチドと、intein を 2 分割したうちの残りの N-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白質-N/intein-N] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブ II からなる。

また、同様に、上記第 2 の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対は、少なくとも、標識蛋白質を 2 分割したうちの N-末端側のポリペプチドと、intein を 2 分割したうちの N-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白質-N/intein-N] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブ I と、少なくとも、intein を 2 分割したうちの残りの C-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を 2 分割したうちの残りの C-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白質-C] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブ II からなる。

これらのプローブ対を細胞に導入した場合、プローブ I は細胞質に留まり、プローブ II は核内に局在化される。プローブ I における蛋白質が生物活性物質を認識、結合し、その作用により細胞質から核内へ移行するとき、プローブ I は核内に局在化されたプローブ II と近接する。これにより、プローブ I および II における 2 分割された intein がスプライシングにより切り出され、標識蛋白質が再構築される。したがって、標識蛋白質のシグナルを測定することにより、生物活性物質による蛋白質の核内移行を精度高く検出することが可能となる。

上記第 3 の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対では、intein が藍

藻由来の DnaE であることから、intein が確実に自動的に切り出されるようになる。

上記第 4 の発明の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対では、標識蛋白が発光触媒酵素のルシフェラーゼであることから、プローブ I および II の間でスプライシングが起こり、ルシフェラーゼが再構築された場合、活性中心が形成され、ルミノメーターで容易に検出可能な光を発するようになる。

上記第 5 の発明の蛋白質核内移行検出・定量方法では、プローブ対におけるプローブ I と生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブ II を核内に局在化させ、核内における標識蛋白のシグナルを測定する。このとき、プローブ I は細胞質に留まるが、蛋白質が生物活性物質を認識、結合する場合には、その作用により細胞質から核内へ移行する。すると、プローブ I は核内に局在化されたプローブ II と近接し、プローブ I および II における 2 分割された intein がスプライシングにより切り出され、標識蛋白が再構築される。したがって、標識蛋白のシグナルを測定すれば、生物活性物質による蛋白質の核内移行を確度および精度高く検出することが可能となる。また、蛋白質の核内移行量を定量することも可能となる。

上記第 6 の発明の蛋白質核内移行検出・定量方法では、プローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブ I と生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブ II を核内に局在化させることができる。また、上記第 7 の発明の蛋白質核内移行検出・定量方法では、プローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I と生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブ II を核内に局在化させることができる。

上記第 8 の発明の核内移行誘発物質のスクリーニング方法では、プローブ対におけるプローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局

在化させ、核内移行誘発候補物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定する。候補物質がプローブ I における蛋白質と結合し、蛋白質の核内移行が誘発されると、プローブ I は核内に局在化されたプローブ II と近接し、プローブ I および II における 2 分割された intein がスプライシングにより切り出され、標識蛋白が再構築される。したがって、標識蛋白のシグナルを測定すれば、該候補物質が該蛋白質に対して、蛋白質核内移行誘発物質として作用するものであるか否かを高速で精度高くスクリーニングできる。

上記第 9 の発明の核内移行阻害物質のスクリーニング方法では、プローブ対におけるプローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させ、核内移行阻害候補物質を細胞質に導入した後、蛋白質核内移行誘発物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定する。このとき、候補物質が核内移行阻害物質として作用する場合には、まず、該候補物質が蛋白質と結合する。そのため、蛋白質核内移行誘発物質が蛋白質と結合できなくなり、核内移行が阻害される。したがって、標識蛋白のシグナルが、蛋白質核内移行誘発物質のみを細胞質に導入した場合の標識蛋白のシグナルと比較して減少する。一方、候補物質が核内移行阻害物質として作用しない場合には、該候補物質は蛋白質と結合しないため、蛋白質核内移行誘発物質を細胞質に導入した際に、蛋白質との結合が起こり、蛋白質が核内に移行する。したがって、標識蛋白のシグナルは、蛋白質核内移行誘発物質のみを細胞質に導入した場合の標識蛋白のシグナルと同等となる。

上記第 10 の発明のスクリーニング方法では、プローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させることができる。そして、上記第 11 の発明のスクリーニング方法では、プローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ



I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させることが可能となる。

## 請求の範囲

1. 生物活性物質の作用によって誘発される蛋白質の核内移行を検出、定量するためのプローブ対であって、

少なくとも、intein を 2 分割したうちの C-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を 2 分割したうちの C-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白質-C] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブ I と少なくとも、標識蛋白質を 2 分割したうちの残りの N-末端側のポリペプチドと、intein を 2 分割したうちの残りの N-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白質-N/intein-N] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブ II からなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対。

2. 生物活性物質の作用によって誘発される蛋白質の核内移行を検出、定量するためのプローブ対であって、

少なくとも、標識蛋白質を 2 分割したうちの N-末端側のポリペプチドと、intein を 2 分割したうちの N-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白質-N/intein-N] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブ I と少なくとも、intein を 2 分割したうちの残りの C-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を 2 分割したうちの残りの C-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白質-C] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブ II からなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対。

3. intein は、藍藻由来の DnaE である請求項 1 または 2 のいずれかのプローブ対。

4. 標識蛋白質は、ルシフェラーゼである請求項 1 または 2 のいずれかのプローブ対。

5. 生物活性物質の作用によって誘発される蛋白質の核内移行を検出、定量するための方法であって、請求項1ないし4のいずれかのプローブ対におけるプローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させ、核内における標識蛋白のシグナルを測定することを特徴とする蛋白質核内移行検出・定量方法。

6. 請求項1ないし4のいずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させる請求項5の検出・定量方法。

7. 請求項1ないし4のいずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させる請求項5の検出・定量方法。

8. 蛋白質の核内移行を誘発する物質をスクリーニングするための方法であって、請求項1ないし4のいずれかのプローブ対におけるプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させ、核内移行誘発候補物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定することを特徴とする蛋白質核内移行誘発物質のスクリーニング方法。

9. 蛋白質の核内移行を阻害する物質をスクリーニングするための方法であって、請求項1ないし4のいずれかのプローブ対におけるプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させ、核内移行阻害候補物質を細胞質に導入した後、さらに蛋白質核内移行誘発物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定し、蛋白質核内移行誘発物質のみを細胞質に導入した場合の標識蛋白のシグナルと比較することを特徴とする蛋白質核内移行阻害物質のスクリーニング方法。

10. 請求項1ないし4のいずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させる請求項8または9のスクリーニング方法。

11. 請求項1ないし4のいずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させる請求項8または9のスクリーニング方法。

図 1

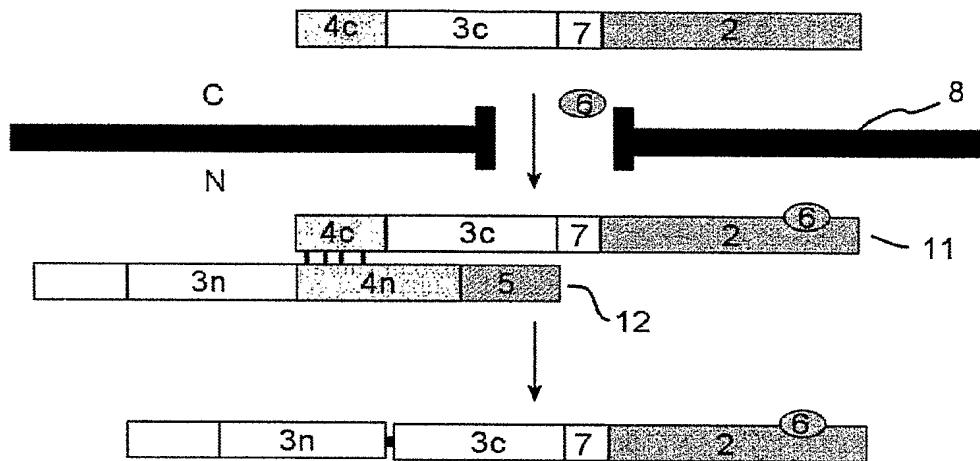


図 2

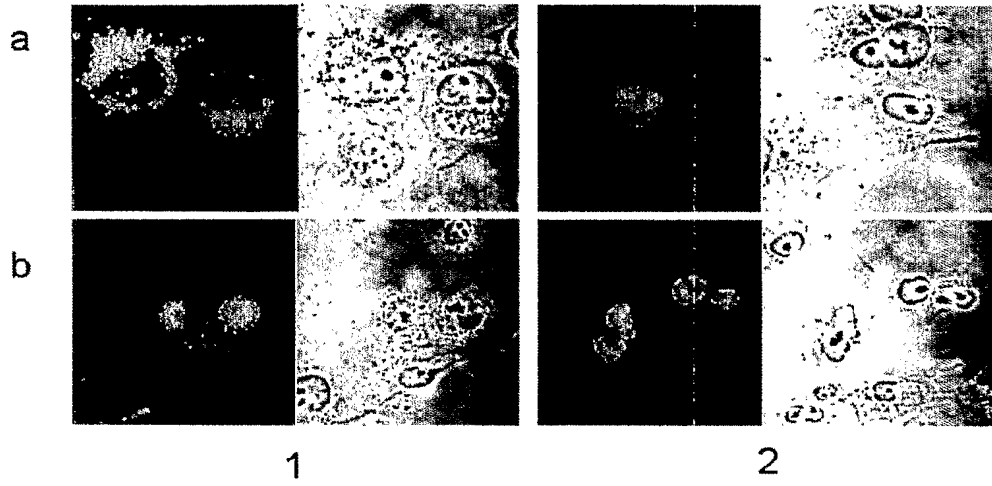


図 3

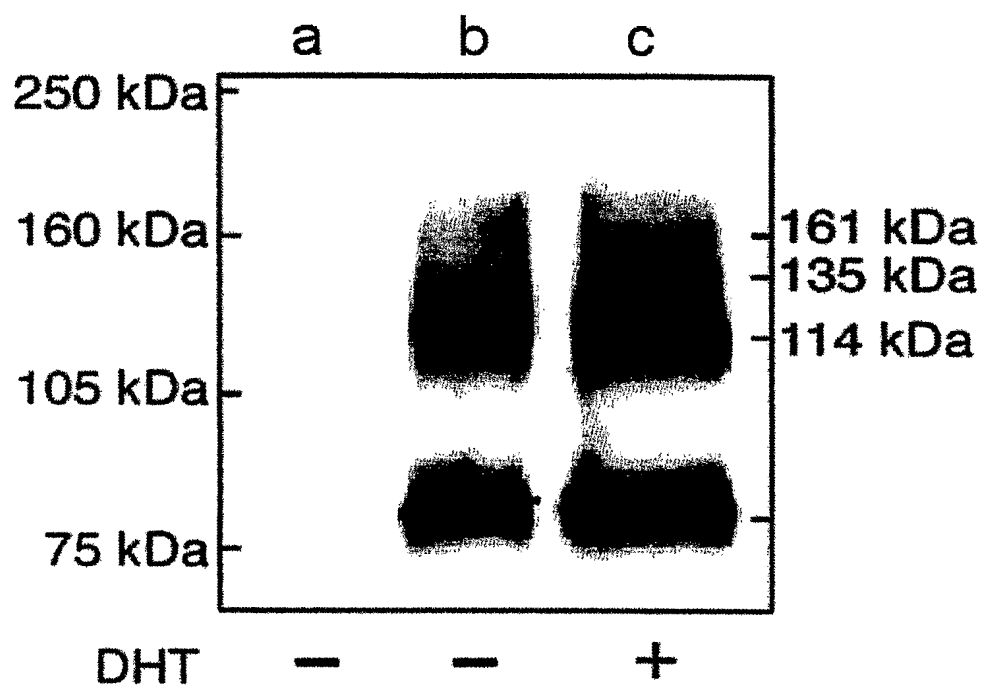


図 4

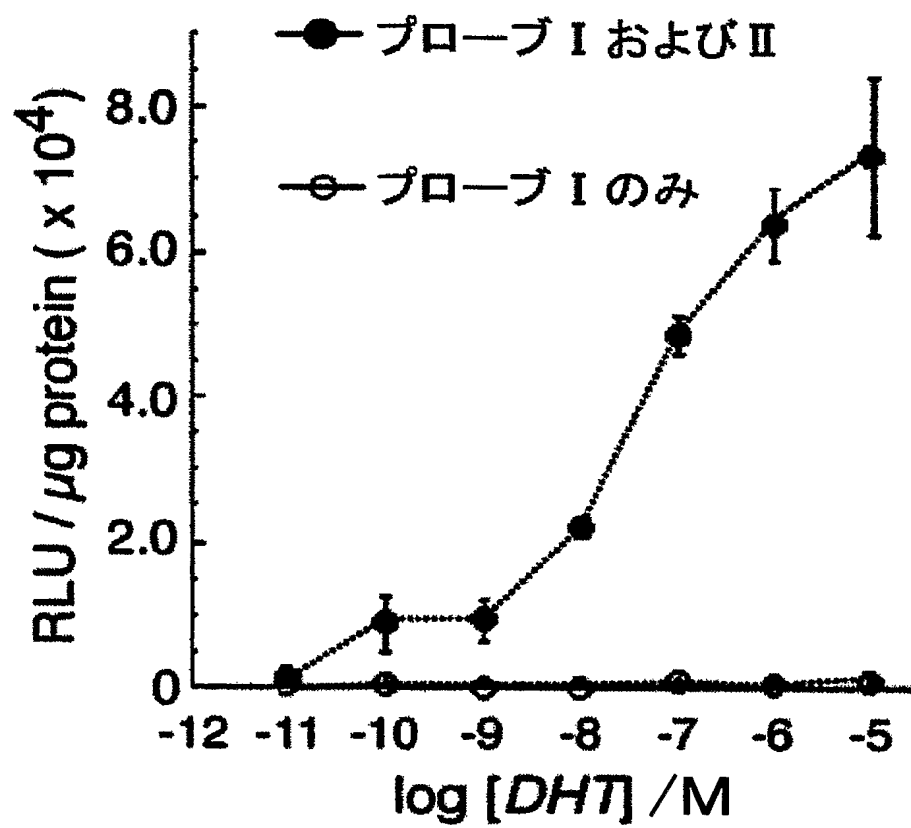




図 5

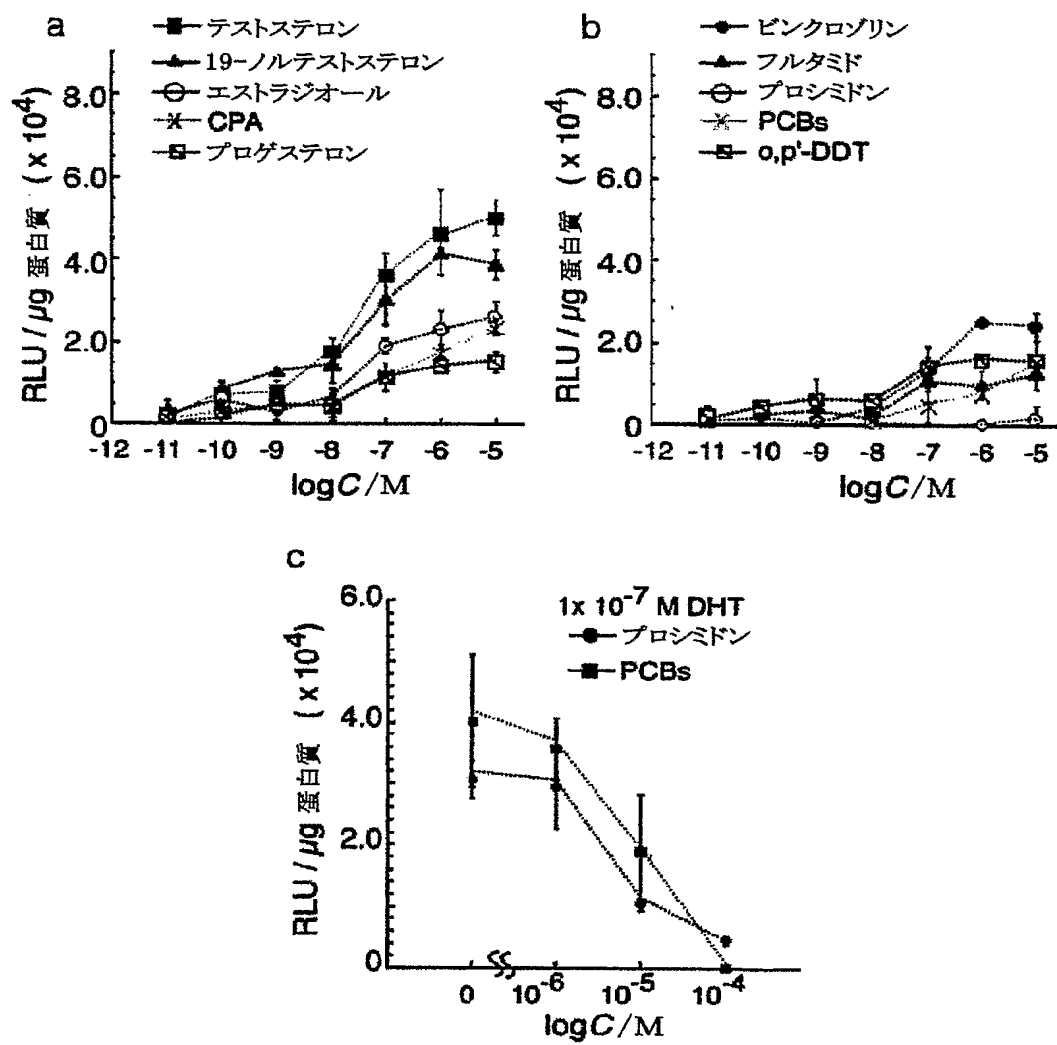


図 6

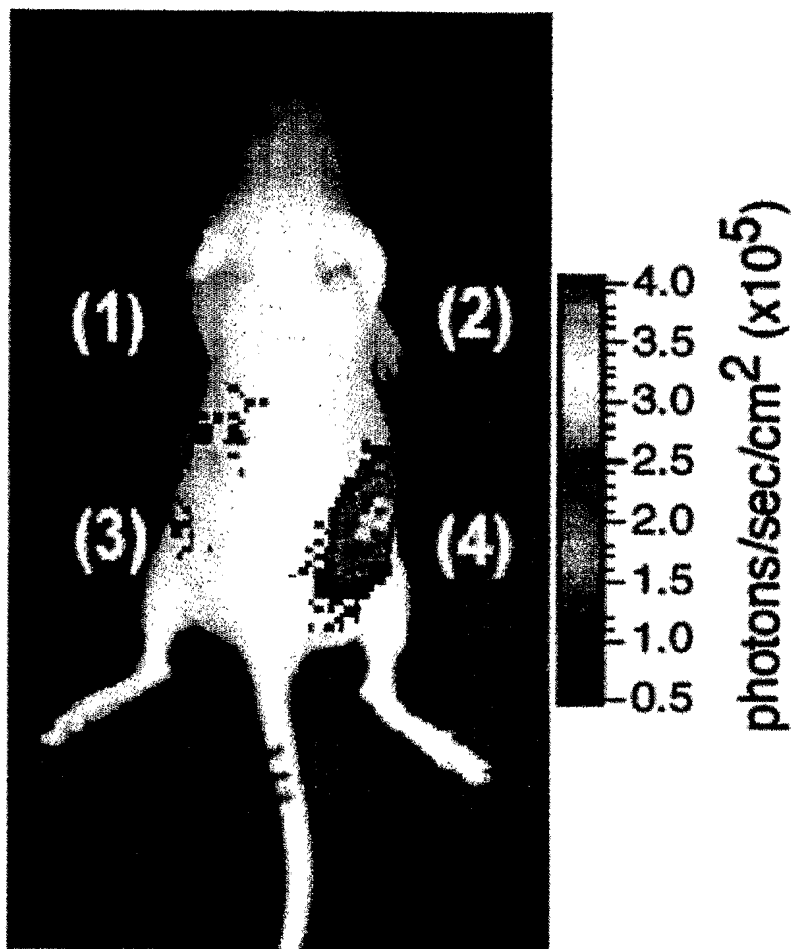


図 7

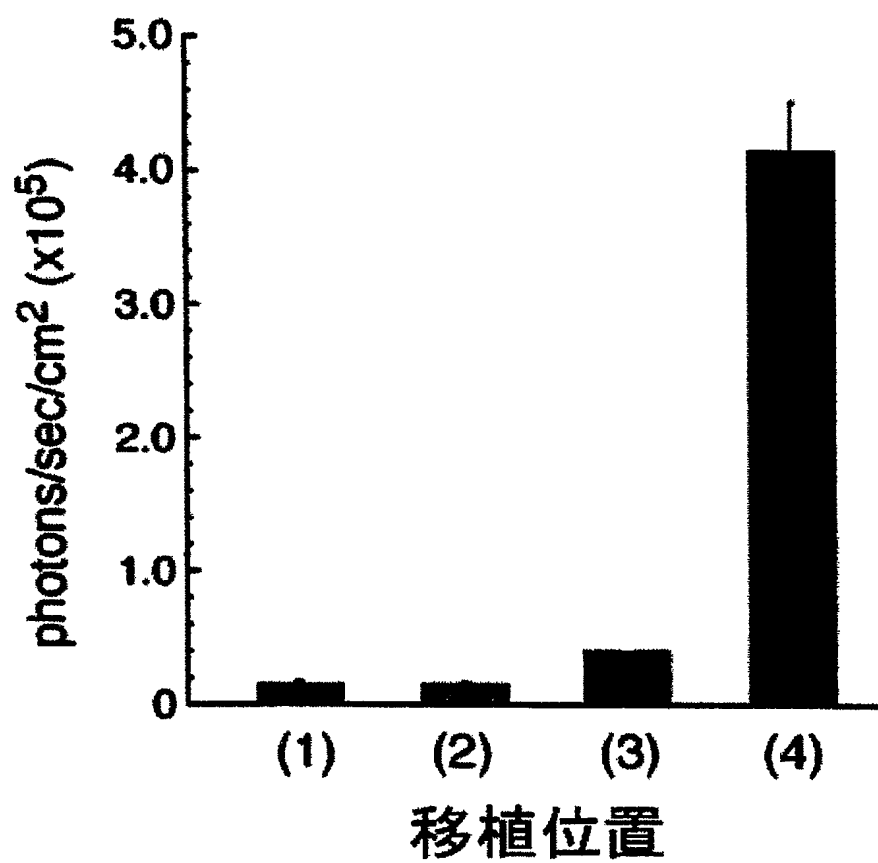


図 8

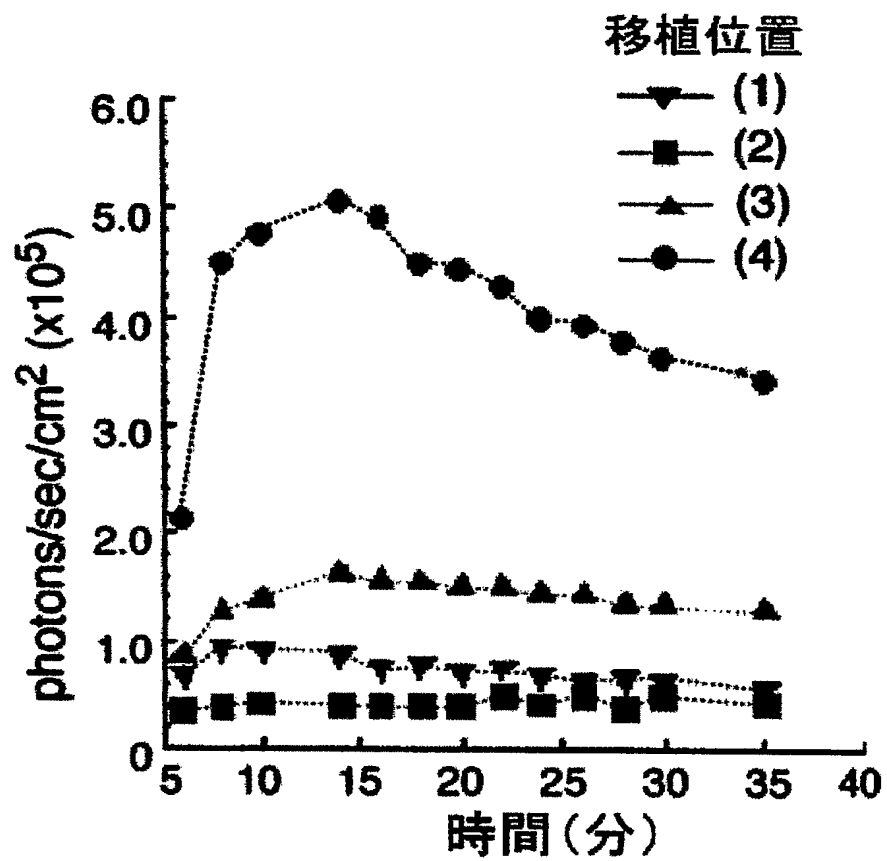


図 9

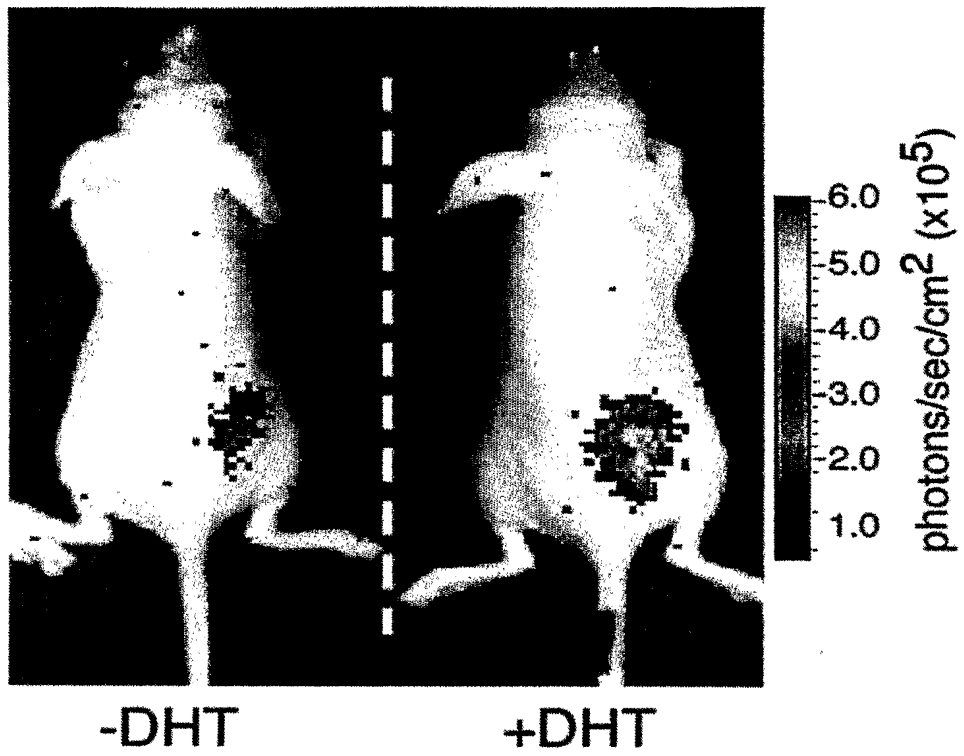


図 10

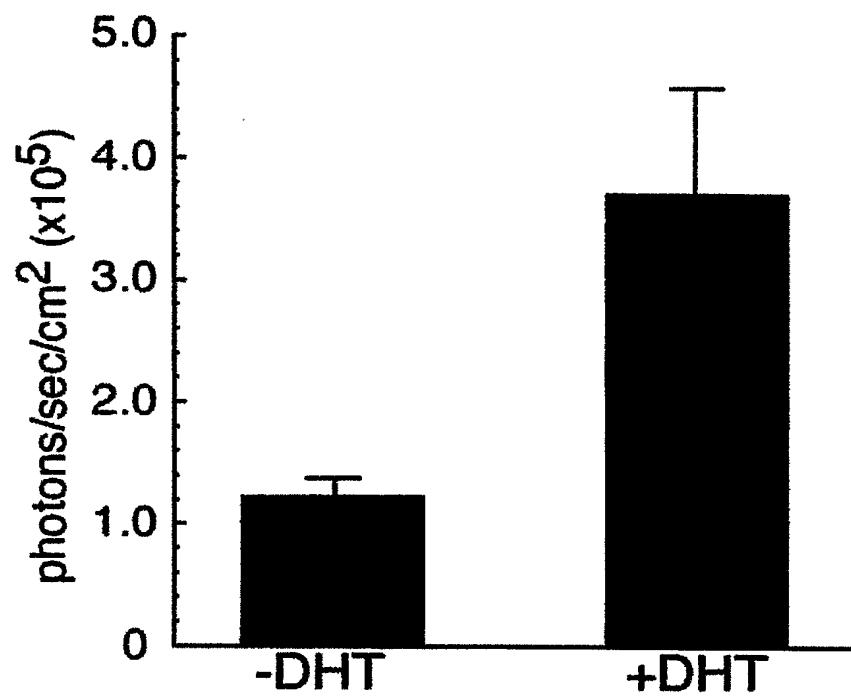


図 11



図 12

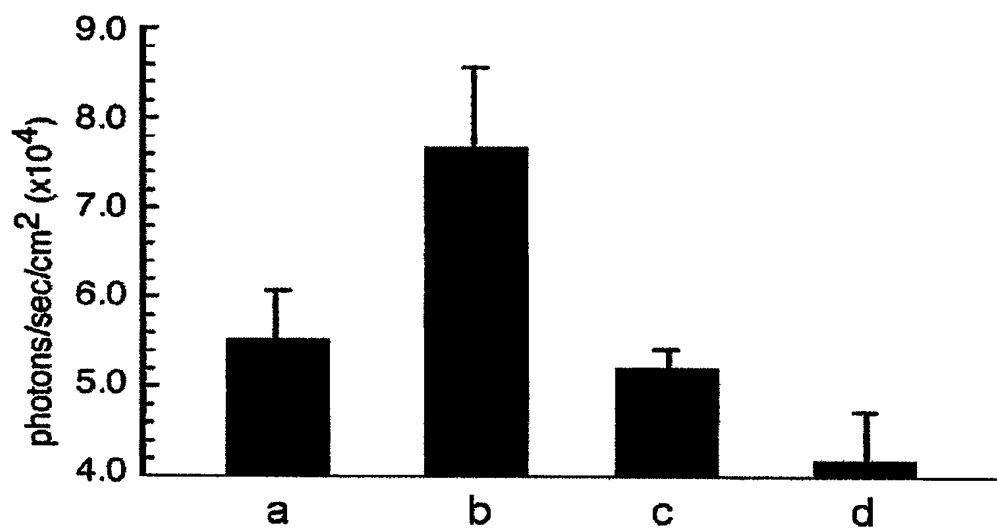




図 13

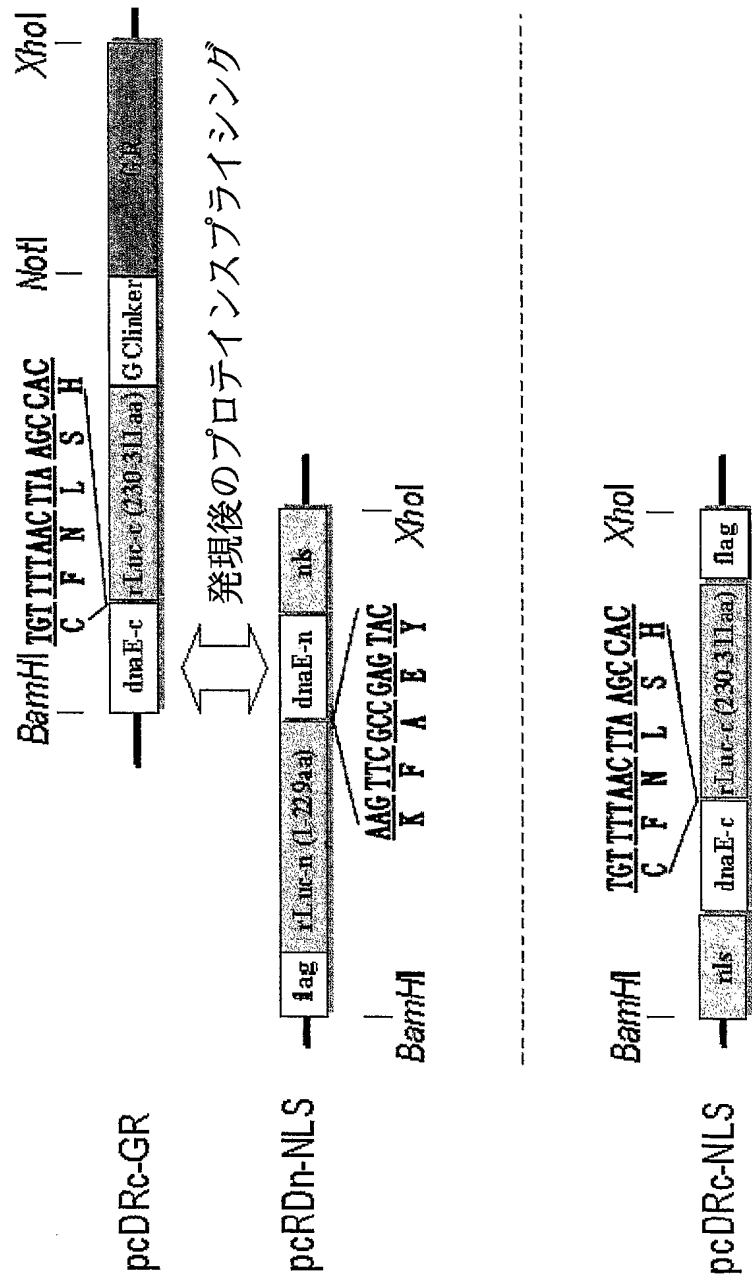


図 14

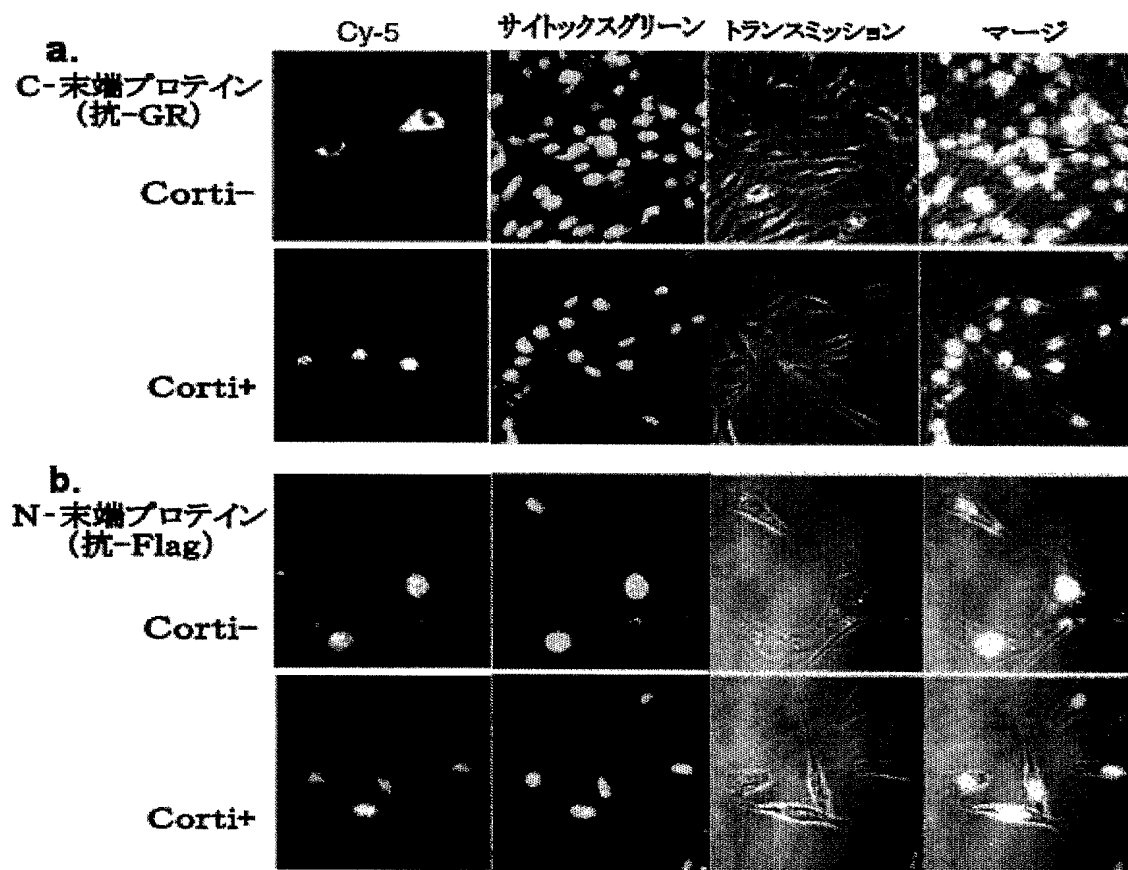


図 15

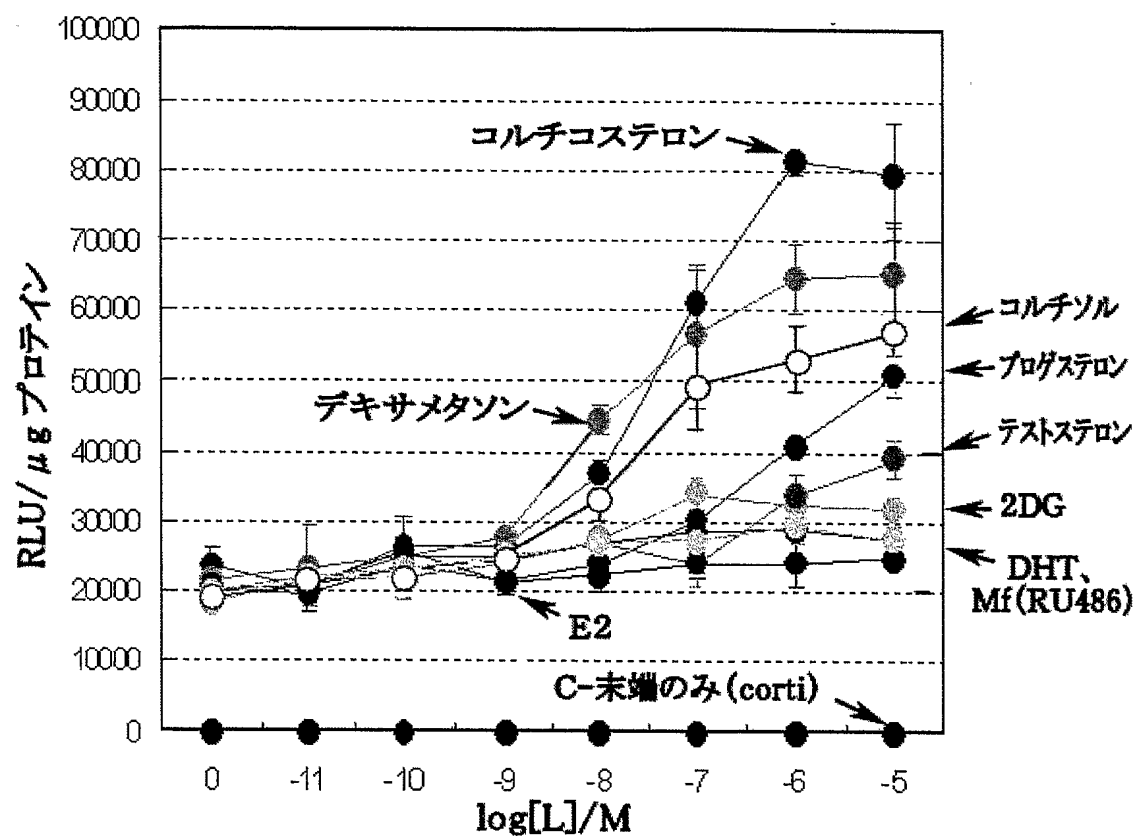


図 16

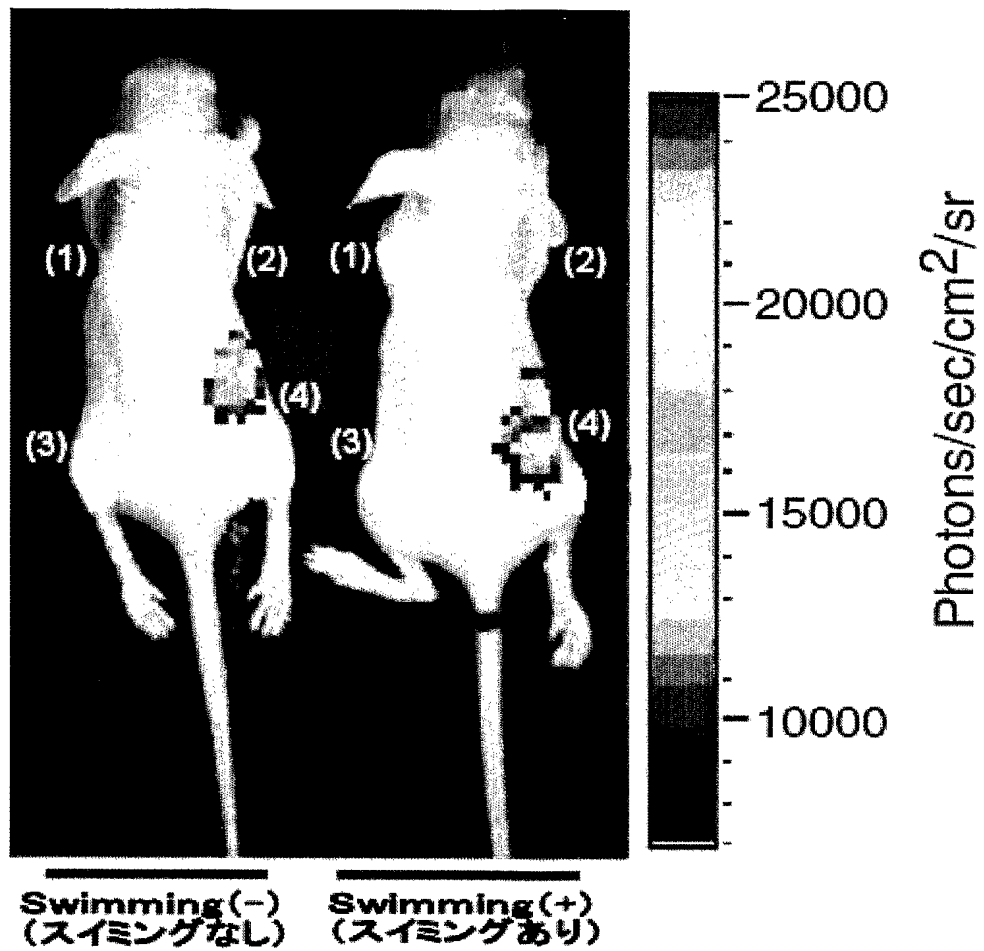


図 17

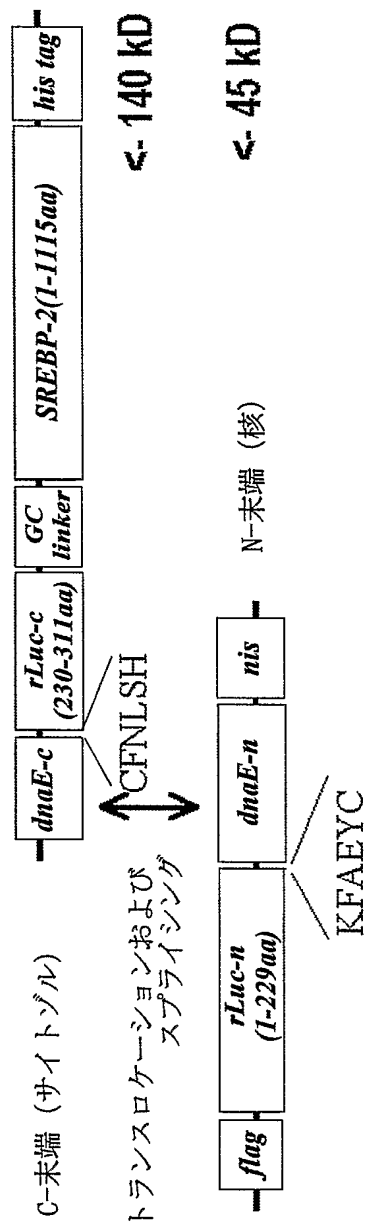


図 18

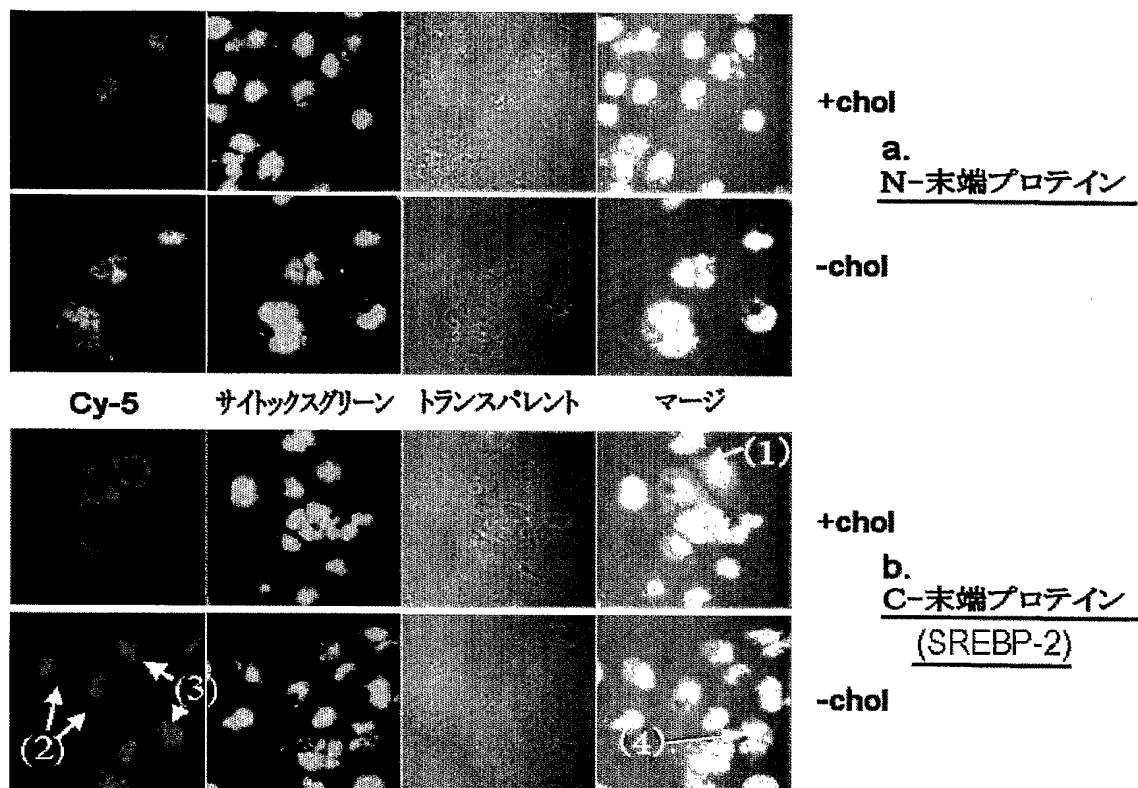


図 19

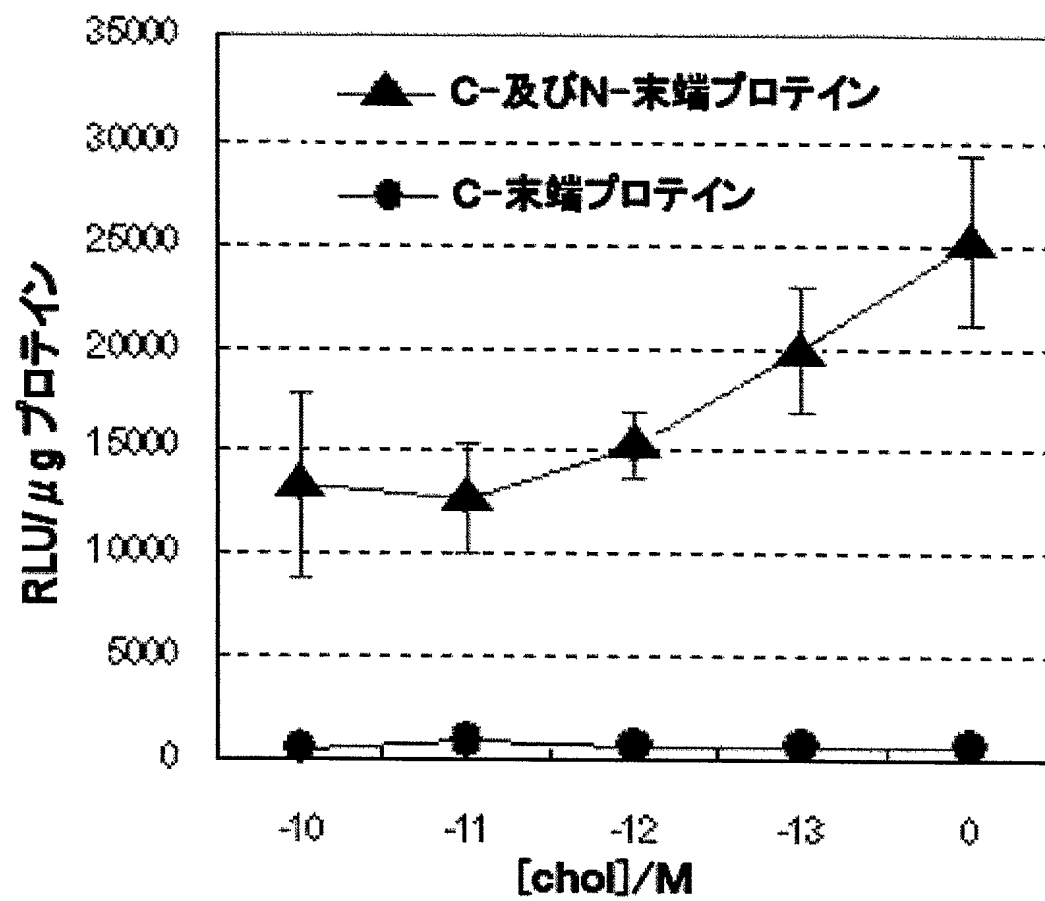


図 20

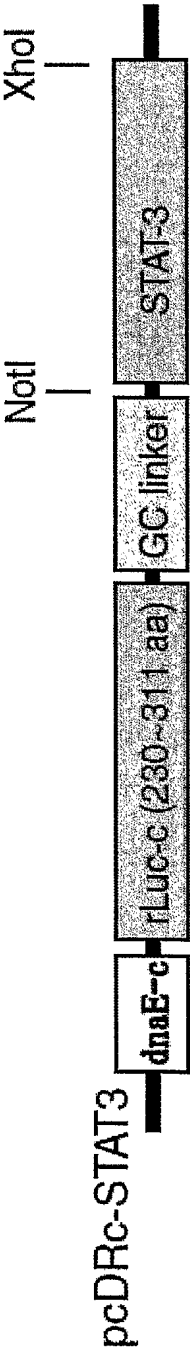




図 21

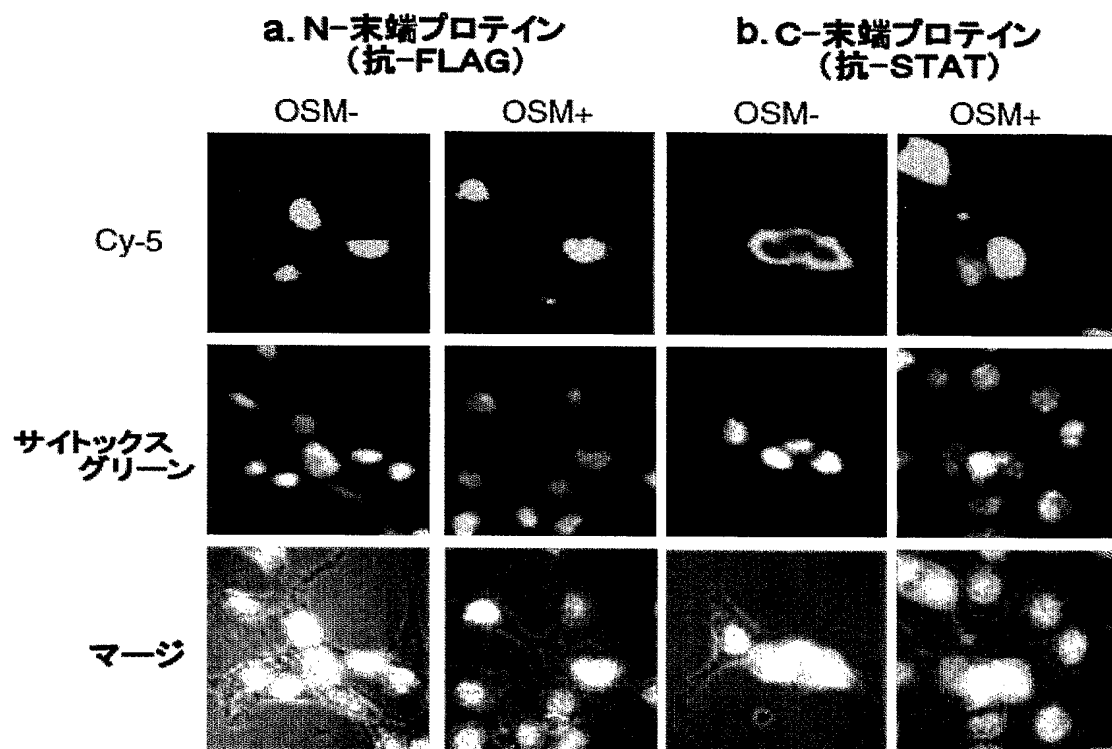
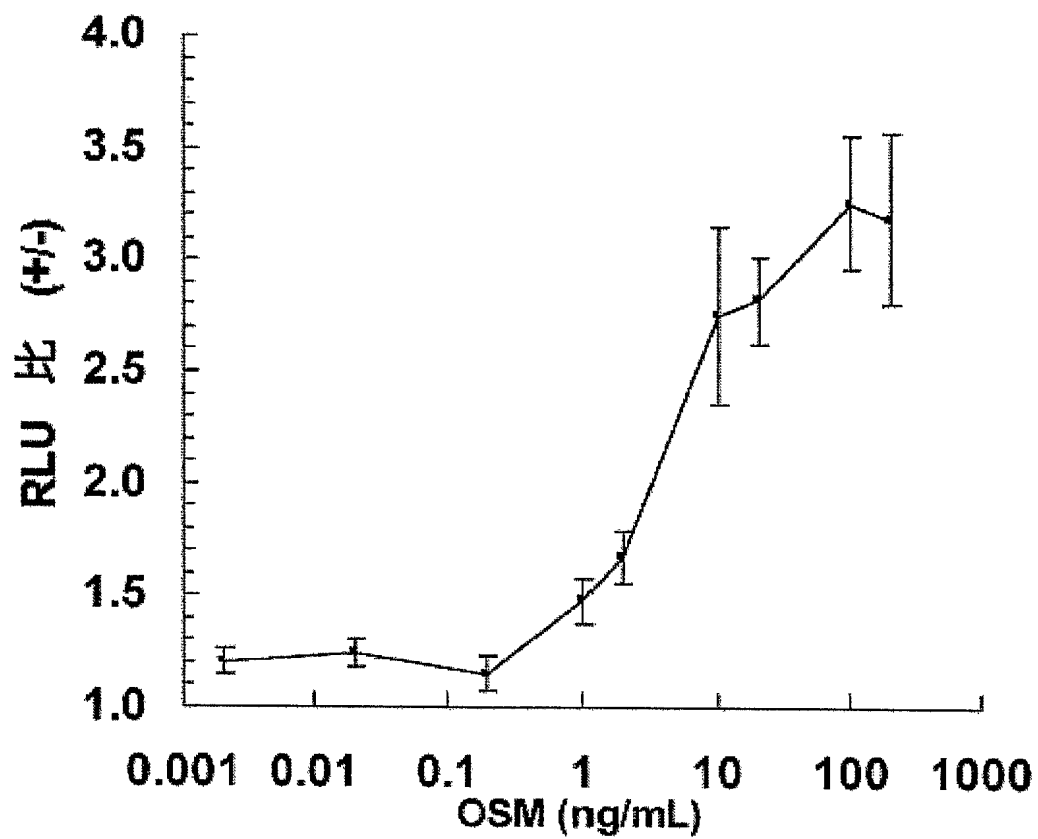


図 22



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> A Pair of Probes for Detecting Protein Nuclear Translocation

<130> 04F057PCT

<150> JP 2004-066424

<151> 2004-03-09

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 1

Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1

5

10

15

Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

<213> *Xenopus laevis*

&lt;400&gt; 2

Lys	Arg	Pro	Ala	Ala	Ile	Lys	Lys	Ala	Gly	Gln	Ala	Lys	Lys	Lys	Lys
1				5					10					15	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus type 1

&lt;400&gt; 3

Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Asn	Arg	Arg	Asn	Arg	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg
1				5					10					15

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 4

Lys Phe Ala Glu Tyr Cys

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 5

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized oligopeptide

<400> 6

Phe Asn Leu Ser His

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 8

Lys Phe Ala Glu Tyr

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 9

Cys Phe Asn Leu Ser His

1 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004591

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OZAWA, T., UMEZAWA, Y. et al., Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing., Analytical Chemistry (2001), Vol.73, No.11, pages 2516 to 2521	1-11
A	OZAWA, T., UMEZAWA, Y. et al., A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing., Analytical Chemistry (2000), Vol.72, No.21, pages 5151 to 5157	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 May, 2005 (17.05.05)

Date of mailing of the international search report

07 June, 2005 (07.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004591

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Paulmurugan R. et al., Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies., Proc Natl Acad Sci USA (2002), Vol.99, No.24, pages 15608 to 15613	1-11
P,A	WO 04/104222 A (Japan Science and Technology Agency), 02 December, 2004 (02.12.04), (Family: none)	1-11
P,X	KIM S.B., Takeaki OZAWA, Yoshio UMEZAWA, "Ikita Mouse Kotainai deno Dansei Hormone-yo Kagaku Busshitsu no Shigeki ni yoru Androgen Receptor no Kakunai Iko no Hishinshu Kashika Bunseki", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 11 March, 2004 (11.03.04), Vol.84 <sup>th</sup> , No.2, page 115	1-11

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ozawa, T, Umezawa Y, et. al., Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing., Analytical Chemistry (2001), Vol. 73, No. 11, p. 2516-2521	1 - 1 1
A	Ozawa, T, Umezawa Y, et. al., A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing., Analytical Chemistry (2000), Vol. 72, No. 21, p. 5151-5157	1 - 1 1

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 0 5 . 2 0 0 5

国際調査報告の発送日

07. 6. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 美葉子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

9 8 3 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Paulmurugan R, et.al., Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies., Proc Natl Acad Sci USA (2002), Vol. 99, No. 24, p. 15608-15613	1 - 1 1
PA	WO 04/104222 A(独立行政法人科学技術振興機構)2004. 12. 02 (ファミリーなし)	1 - 1 1
PX	KIM S B, 小沢岳昌, 梅沢喜夫, 生きたマウス個体内での男性ホルモン様化学物質の刺激によるアンドロゲンリセプターの核内移行の非侵襲可視化分析, 日本化学会講演予稿集(2004. 3. 11), Vol. 84 <sup>th</sup> , No. 2, p. 115	1 - 1 1